

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Hagl

**Das Kardiotomiereservoir: Eine neuartige Zellquelle für das kardiovaskuläre  
Tissue Engineering**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Sophie Alexandra Viktoria von Nathusius

aus

London

2020

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralf Sodian

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. G. Nollert  
Prof. Dr. med. P.E. Müller  
Prof. Dr. med. A. Schober

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Nikolaus Thierfelder

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 1.10.2020



# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>5</b>
<b>KURZZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>7</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
1.1 GRUNDLAGEN DES HERZ-KREISLAUF-SYSTEMS	12
1.2 ANGEBORENE HERZFEHLER	13
1.2.1 GESCHICHTLICHE ENTWICKLUNG	14
1.2.2 THERAPIE BEI ANGEBORENEN HERZFEHLERN	14
1.3 HERZKLAPPENERKRANKUNGEN	17
1.3.1 HERZKLAPPENSTENOSE AM BEISPIEL DER AORTENKLAPPENSTENOSE	17
1.3.2 HERZKLAPPENINSUFFIZIENZ AM BEISPIEL DER MITRALKLAPPENINSUFFIZIENZ	19
1.4 HERZKLAPPENERSATZ	21
1.4.1 MECHANISCHE HERZKLAPPEN	21
1.4.2 BIOLOGISCHE HERZKLAPPEN	22
1.5 HERZ-LUNGEN-MASCHINE	23
1.6 TISSUE ENGINEERING	25
1.6.1 ANFÄNGE DES TISSUE ENGINEERINGS	25
1.6.2 PRINZIPIEN DES TISSUE ENGINEERINGS	26
1.6.3 ZELLEN FÜR KARDIOVASKULÄRES TISSUE ENGINEERING	28
<b>2 METHODEN</b>	<b>31</b>
2.1 PATIENTENKOLLEKTIV	31
2.2 ZELLISOLATION AUS BESTANDTEILEN DES KARDIOTOMIERESERVOIRS	31
2.2.1 ZELLISOLATION AUS DEM VOLLBLUT	32
2.2.2 ISOLATION AUS FILTERN DES KARDIOTOMIERESERVOIRS	34
2.2.3 ISOLATION VON ENDOTHELZELLEN UND FIBROBLASTEN AUS DER VENE	37
2.3 ZELLKULTUR	38
2.3.1 PASSAGIEREN DER ZELLEN	38
2.3.2 KRYOKONSERVIERUNG DER ZELLEN	38
2.3.3 AUFTAUEN DER ZELLEN	39
2.4 IMMUNZITOLOGIE	39
2.4.1 VORBEREITUNG	39
2.4.2 FÄRBUNG FÜR DIE IMMUNZITOLOGIE UNTER DEM LICHTMIKROSKOP	39
2.4.3 FÄRBUNG FÜR DIE IMMUNFLUORESCENZ	40
2.5 WST-1 PROLIFERATIONSASSAY	42
2.5.1 HINTERGRUND	42
2.5.2 VORBEREITUNG	42
2.5.3 PHOTOMETRIE	42
2.6 ZELLBESIEDELUNG AUF POLYURETHAN-PATCHES	45
2.7 IMMUNHISTOCHEMIE MITTELS IMMUNFLUORESCENZ	46
2.7.1 ANFERTIGUNG VON KRYOSCHNITTEN	46
2.7.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG	46
2.8 VITAL-LETAL FÄRBUNG	47
2.9 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE	48
2.9.1 FIXIERUNG	48

2.9.2	AUFSTEIGENDE ALKOHOLREIHE	48
2.9.3	KRITISCH-PUNKT-TROCKNUNG	48
2.9.4	GOLDBESCHICHTUNG AM SPUTTER COATER	49
2.9.5	RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ANALYSE	49
<b>2.10</b>	<b>ERFASSUNG DER PATIENTENDATEN</b>	<b>50</b>
<b>2.11</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>50</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>ZELLMORPHOLOGIE DER PRIMÄRKULTUR</b>	<b>51</b>
3.1.1	WACHSTUM VON SPINDELFÖRMIGEN ZELLEN	51
3.1.2	WACHSTUM VON PFLASTERSTEINARTIGEN ZELLEN	52
3.1.3	WACHSTUM VON ZELLEN ANDERER MORPHOLOGIE AUS GROBPORIGEN FILTERNETZEN	54
<b>3.2</b>	<b>IMMUNZYTLOGIE</b>	<b>55</b>
<b>3.3</b>	<b>WST-1 PROLIFERATIONSASSAY DER ISOLIERTEN ZELLEN</b>	<b>58</b>
3.3.1	WACHSTUMSVERHALTEN DER FIBROBLASTEN	58
3.3.2	WACHSTUMSVERHALTEN DER ENDOTHELZELLEN	61
<b>3.4</b>	<b>IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE</b>	<b>63</b>
3.4.1	NACHWEIS DER ZELLBESCHICHTUNG	63
3.4.2	NACHWEIS DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX	63
<b>3.5</b>	<b>RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE</b>	<b>65</b>
3.5.1	NATIVPROBEN	65
3.5.2	ZELLBESIEDELUNG DER POLYURETHANGERÜSTE	65
<b>3.6</b>	<b>VITALITÄTSASSAY</b>	<b>67</b>
<b>3.7</b>	<b>PATIENTENDATEN UND STATISTISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>68</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>HOHE VERFÜGBARKEIT DER ZELLQUELLE</b>	<b>71</b>
<b>4.2</b>	<b>METHODIK UND HANDHABUNG</b>	<b>72</b>
<b>4.3</b>	<b>ISOLATION VON ENDOTHELZELLEN AUS DEM VOLLBLUT</b>	<b>73</b>
<b>4.4</b>	<b>ISOLATION VON FIBROBLASTEN AUS FILTERNETZEN</b>	<b>74</b>
<b>4.5</b>	<b>VERGLEICH MIT KONTROLLGRUPPE UND PATIENTENDATEN</b>	<b>75</b>
<b>4.6</b>	<b>KOMPATIBILITÄT FÜR DEN EINSATZ IM TISSUE ENGINEERING</b>	<b>76</b>
<b>4.7</b>	<b>ANWENDUNG FÜR DIE THERAPIE VON KARDIOVASKULÄREN ERKRANKUNGEN</b>	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>95</b>
<b>7.1</b>	<b>GERÄTE- UND MATERIALLISTE</b>	<b>95</b>
7.1.1	GERÄTE UND AUSTRÜSTUNG	95
7.1.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	96
7.1.3	REAGENZIEN	98
<b>7.2</b>	<b>UNBEDENKLICHKEITSBESCHEINIGUNG</b>	<b>102</b>
<b>7.3</b>	<b>IMMUNFLUORESCENZ</b>	<b>104</b>
<b>7.4</b>	<b>NACHWEIS DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX</b>	<b>105</b>
<b>7.5</b>	<b>STATISTISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>111</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
<b>A.</b>	Arterie
<b>a.d.</b>	aqua destillata
<b>AEC</b>	3-Amino-9-Ethylcarbazole
<b>AKE</b>	Aortenklappenersatz
<b>al.</b>	Alumni
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>c</b>	Konzentration
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>d</b>	Tag
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>EC</b>	Endothelzellen
<b>ECGM</b>	Endothelial Cell Growth Medium
<b>EPC</b>	Endotheliale Progenitorzellen
<b>ESC</b>	Embryonale Stammzellen
<b>EZM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>FB</b>	Fibroblasten
<b>FCS</b>	Fetal Calf Serum
<b>FGM</b>	Fibroblast Growth Medium
<b>G</b>	Relative Zentrifugalbeschleunigung
<b>g</b>	Gramm
<b>GER</b>	Germany
<b>h</b>	Stunde
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>HLM</b>	Herz-Lungen-Maschine
<b>HSC</b>	Hämatopoetische Stammzellen
<b>I.E.</b>	Internationale Einheiten
<b>KR</b>	Kardiotomiereservoir
<b>m</b>	Meter
<b>M199</b>	Earle's Medium 199
<b>mA</b>	Milliampere
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minute
<b>mio</b>	Millionen
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mmHg</b>	Millimeter Quecksilbersäule
<b>n</b>	Anzahl
<b>nm</b>	Nanometer

<b>OP</b>	Operation
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PI</b>	Propriumiodid
<b>PU</b>	Polyurethan
<b>REM</b>	Rasterelektronenmikroskopie
<b>s</b>	Sekunde
<b>s.o.</b>	siehe oben
<b>SiR</b>	Silicon Rhodamine
<b>SMC</b>	Smooth Muscle Cell
<b>t</b>	Zeit
<b>Tab</b>	Tabelle
<b>TAVI</b>	transcatheter aortic valve implantation
<b>TE</b>	Tissue Engineering
<b>TE-7</b>	Human Thymic Fibroblasts Antikörper
<b>u</b>	Unit
<b>V.</b>	Vene
<b>vWF</b>	von Willebrand Faktor
<b>WST-1</b>	Water Soluble Tetrazolium
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>µM</b>	Mikromol

# Kurzzusammenfassung

## ZIELSETZUNG:

Zellquellen für das kardiovaskuläre Tissue Engineering (TE) sind limitiert vorhanden und in ihrer Verwendung unterliegen sie zahlreichen Einschränkungen. Um dem Bedarf humaner Zellen für die Forschung und Erzeugung von autologen Implantaten weiterhin nachkommen zu können, wurde das Kardiotomiereservoir (KR) als eine neue Zellquelle untersucht.

## MATERIAL UND METHODEN:

Nach Operationen unter Verwendung von Herz-Lungen-Maschinen wurden die KRs (n = 10) aus dieser entfernt und die Filter entnommen. Die Filter der venösen Sektion und der Kardiotomiektion des Reservoirs wurden entweder zugeschnitten und in Petrischalen kultiviert oder mittels Waschung ähnlich den Blutproben bearbeitet. Zusätzlich erfolgte während der Operation eine Blutentnahme aus dem KR, an die sich die Zellisolation mittels Dichtegradientenzentrifugation anschloss. Nach der vier- bis sechswöchigen Kultivierung konnten verschiedene Zelllinien von Fibroblasten (FB) und Endothelzellen (EC) gewonnen und für die Antikörperfärbungen und Proliferationsassays kryokonserviert werden. Darüber hinaus wurden Zellen auf Polyurethan (PU) Patches besiedelt ( $7,5 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>) und mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM), Life / Dead<sup>®</sup> Assay und Immunhistochemie ausgewertet. Als Kontrollgruppe (n=2) dienten aus der Vena saphena magna isolierte FB und EC.

## ERGEBNISSE:

Die erfolgreiche Extraktion von FB (n = 7) und EC (n = 4) aus dem KR und Vollblut der Patienten wurde mit dem FB-spezifischen Antikörper gegen TE-7 und dem EC spezifischen Antikörpern gegen CD31 und 'von Willebrand Faktor' (vWF) nachgewiesen. Eine konfluente und vitale Zellschicht nach Besiedelung auf PU Patches wurde durch REM-Analyse, Life / Dead<sup>®</sup> Assay und Immunhistochemie visualisiert. Der Aufbau einer extrazellulären Matrix (EZM) wurde durch positive Färbung gegen Collagen IV, Laminin, Fibronectin und Elastin bestätigt. Im WST-1 Proliferationsassay zeigt sich eine positive Korrelation zwischen Bypasszeit ( $129,3 \pm 38,4$  min) und dem Wachstumsverhalten der Fibroblasten. Ferner bestehen schwach negative Korrelationen zwischen dem Lebensalter ( $66,7 \pm 10,1$  Jahre) und EuroScore II ( $1,7 \pm 1,1$ ) mit dem Fibroblastenwachstum.

## **ZUSAMMENFASSUNG:**

Vitale FB- und EC-Zelllinien wurden nach der Operation aus dem Kardiotomiereservoir isoliert und auf ihre Verwendbarkeit im kardiovaskulären TE hin untersucht. Der leichte Zugang und die hohe Verfügbarkeit bieten nach Durchführung weiterer Versuchsreihen eine mögliche Zellquelle für eine zukünftige Anwendung im Bereich des TE.

# 1 Einleitung

Die Idee des Tissue Engineering (TE) und die damit verbundene künstliche Herstellung von Gewebe zeigt zunehmend erfolgsversprechende Ansätze in der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen. Diese zählen mit 40% zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland [1]. Weltweit tragen die kardiovaskulären Erkrankungen zu den meisten Todesursachen bei, worunter viele mit Herzklappenerkrankungen assoziiert sind. Aufgrund der zunehmenden Alterung der Gesellschaft bedürfen 2,5% der Bevölkerung der USA und Europas aufgrund eines Klappendefekts einer operativen oder minimalinvasiven Therapie [2-4]. Auch in den Entwicklungs- und Schwellenländern ist die Lebenserwartung in den letzten Jahrzehnten stetig gestiegen. Dort trägt allerdings das Rheumatische Fieber zu einer hohen Anzahl behandlungsbedürftiger Patienten mit einer Herzklappenerkrankung bei [5].

In den meisten Fällen ist der vollständige Herzklappenersatz bei fehlender Möglichkeit der Rekonstruktion unabdingbar. Im Hinblick auf die Gesamtbevölkerung geht man inzwischen davon aus, dass sich die Zahl der Patienten, die einen Herzklappenersatz benötigen werden, zwischen den Jahren 2003 und 2050 verdreifachen wird [6, 7].

Dieser zunehmende Bedarf von Herzklappen steigert den Anreiz die Therapieformen kontinuierlich zu verbessern und stellt die medizinische Forschung vor eine Herausforderung. Aktuell werden die erkrankten Herzklappen mittels Implantation von biologischen oder mechanischen Prothesen ersetzt. Allerdings geht diese Therapie mit einer Reihe von Nebenwirkungen und Limitationen einher. Mechanische Klappen sind mit einem erhöhten Risiko für Thromboembolien assoziiert und erfordern eine lebenslange antikoagulatorische Prophylaxe [8, 9]. Biologische Herzklappen dagegen sind trotz Fixierung mit Glutaraldehyd, welches immunologische Prozesse verhindern soll, in ihrer Lebensdauer verkürzt und neigen meist zu vermehrter Kalkablagerung. So werden diese Klappen bevorzugt bei älteren Patienten eingesetzt, da bei jungen Patienten in vielen Fällen nach ca. 15-20 Jahren eine Reoperation erforderlich ist [10, 11].

Eine Lösung für die bestehenden Limitationen der aktuellen Therapiemöglichkeiten, wie auch für den steigenden Bedarf an Herzklappen wird schon seit längerer Zeit in dem Feld der regenerativen Medizin gesehen. Eine Herzklappe, die aus autologen (Spender ist gleichzeitig Empfänger) oder homologen Zellen (Spender und Empfänger entstammen der gleichen Spezies) in vitro hergestellt wurde, besitzt idealerweise die Fähigkeit zur Selbstreparatur und zu einem lebenslangen Umbauprozess [12, 13]. Durch diese natürliche Eignung zu Wachstum

und Regeneration wäre die Herzklappe potentiell unbegrenzt haltbar und würde dadurch das Risiko einer erneut erforderlichen Operation reduzieren. Das Konzept des TE beruht darauf, dass durch eine Kombination aus Zellen und einem dreidimensionalen Trägermaterial erkranktes Gewebe ganz oder teilweise ersetzt werden kann [8, 10, 14].

Auch für die Gruppe der angeborenen Herzerkrankungen spielt dieser neuartige Therapieansatz eine große Rolle. In Deutschland werden pro Jahr mehr als 6500 Säuglinge mit angeborenem Herzfehler geboren [15]. Die meisten dieser Kinder benötigen einen operativen Eingriff. Im Herzbericht von 2018 wird von insgesamt 5913 herzchirurgischen Eingriffen bei Kindern gesprochen, davon 45% im ersten Lebensjahr [15]. Erfreulich ist, dass der Anteil von angeborenen Herzfehlern als Todesursache bei Kindern von 1987 bis 2005 deutlich zurückgegangen ist [16]. Auch die steigende Zahl Erwachsener mit einer angeborenen Herzkrankheit spricht für die verbesserte Wirksamkeit der Therapien [17]. Dennoch wird weiterhin der Grund für die erhöhte Sterblichkeit zu Teilen bei der implantierten Kunststoffprothese gesehen, die als Fremdkörper lebenslang im heranwachsenden Körper verweilt [18]. Es ist bereits bekannt, dass auch hier die Implantation von körpereigenem Gewebe z.B. in Form einer Gefäßprothese helfen kann, die therapeutischen Grenzen der herkömmlichen Prothese zu umgehen. So könnten Kinder von diesem neuartigen Therapieansatz besonders profitieren [19-21].

Um derzeitige Limitationen wie fehlendes Wachstum, Thromboembolien und Infektionen zu überbrücken, wurden bereits verschiedene Ansätze etabliert, um den idealen Graft zu entwickeln [22]. Allerdings wird die Auswahl geeigneter Zellquellen durch unterschiedliche Differenzierungs- und Wachstumsfähigkeiten der Zellen, Entnahmetechniken, mögliche Tumormformationen, ethischen Bedenken und die aktuelle Gesetzeslage stark eingeschränkt.

Eine neuartige Zellquelle zu evaluieren, um den Fortschritt des kardiovaskulären TEs voranzutreiben, ist Ziel dieser Arbeit. Die Erkenntnis, dass es bei herzchirurgischen Eingriffen bzw. dem, daraus resultierenden, vaskulären Stress, zur Freisetzung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark kommt, führte zu der Idee, diese Zellen im Rahmen von herzchirurgischen Operationen zu gewinnen. Das Kardiotomiereservoir (KR) der Herz-Lungen-Maschine (HLM), welches das zirkulierende Blut während der Operation filtert und speichert, bot sich als potentielle Quelle großer Zellmengen an. Hinzu kam die Überlegung, dass eine große Menge abgesaugter Flüssigkeit aus dem chirurgischen Gebiet in das KR drainiert und womöglich in den vorhandenen Filtern abgefangen wird [23-25]. So wurden unter der Annahme der



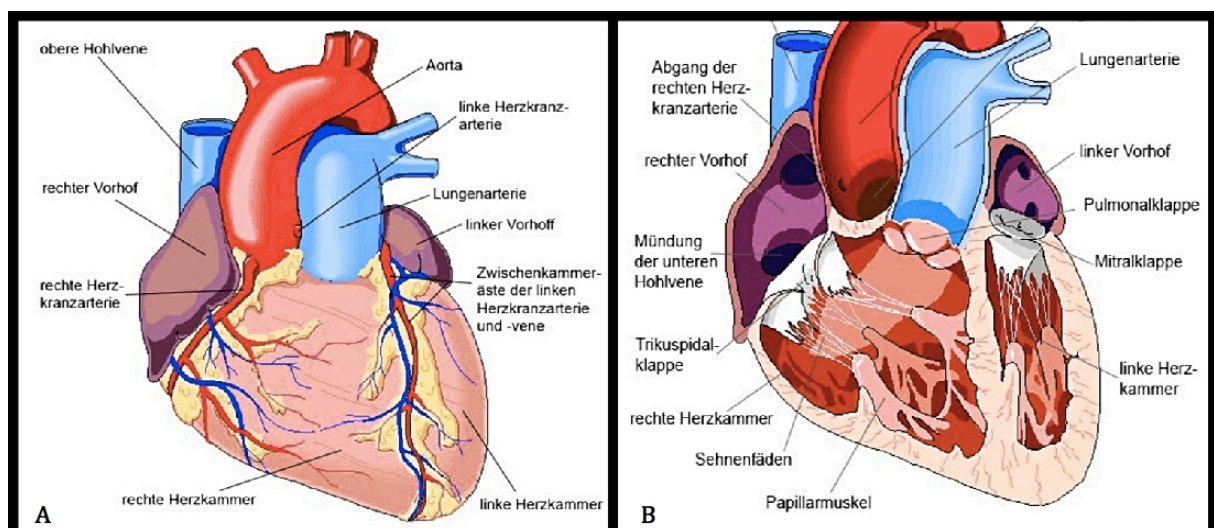
erhöhten Zellkonzentration im Blut und der möglichen Akkumulation der Zellen in den Filtern des KR, die einzelnen Filter nach der Operation entfernt und entsprechend kultiviert.

Mit der Intention einer Konzepterprobung, um eine neue Zellquelle für das TE zu generieren, fokussiert sich diese Arbeit auf die Isolation und Kultivierung von sowohl Fibroblasten (FB) als auch Endothelzellen (EC), die Testung auf ihre Kompatibilität im Einsatz von TE und die Untersuchung der Wachstumsraten in Bezug auf patientenspezifische Einflussfaktoren.

## 1.1 Grundlagen des Herz-Kreislauf-Systems

Das Herz ist ein Hohlmuskel und befindet sich im Brustkorb im mittleren Abschnitt des unteren Mediastinums. Es besteht aus verschiedenen Gewebearten unterschiedlicher Zelltypen und wird in zwei Vorhöfe und zwei Herzkammern eingeteilt (Abb. 1 A+B). Um die Entwicklung von Thromben zu vermeiden ist der Innenraum mit Endothel ausgekleidet. Darauf folgt das Myokard und macht die dickste Schicht der Herzwand aus. Außen wird das Herz durch eine Bindegewebsschicht (Epikard) umhüllt und von einer Serosa (Perikard) eingeschlossen.

Das sauerstoffarme Blut fließt aus allen Körperregionen über die untere und obere Hohlvene (Vena cava superior und inferior) in den rechten Vorhof und wird über die Trikuspidalklappe in die rechte Kammer geleitet, von wo es über die Pulmonalklappe in die Lungenarterie fließt. In den beiden Lungenflügeln wird das Blut mit Sauerstoff angereichert. Von dort fließt es durch die Lungenvenen in den linken Vorhof und über die Mitralklappe in die linke Kammer des Herzens. In der Auswurfphase des Herzens wird das Blut über die Aortenklappe in die Aorta zurück in die Peripherie gepumpt. Der Aufbau des linken Herzens entspricht dem des rechten. Die Aorten- und Pulmonalklappe trennen die großen Gefäße des Kreislaufs vom Herzen und werden aufgrund ihres charakteristischen Aufbaus als Taschenklappen bezeichnet. Im Gegensatz dazu bilden auf der Ebene der Vorhöfe die Segelklappen, die Mitralklappe und Trikuspidalklappe die Trennung zu den Kammern [26-28].



**Abbildung 1: Aufbau des menschlichen Herzens und der großen Gefäße (A-B)** Bildquelle: <http://www.htchirurgie.uniklinikum-jena.de/>

Das Herz pumpt mit einer variierenden Frequenz eine bestimmte Menge an Blut pro Minute in die Gefäße. Damit dieser Vorgang angetrieben wird, bedarf es eines elektrischen Reizes. Dieser wird im Sinusknoten oder in anderen Schrittmacherzentren des Herzens generiert. Hier entsteht ein Aktionspotential, welches sich über das Myokard ausbreitet und zur Kontraktion des Herzmuskels führt. Die Herzaktion wird in die Systole, bei der sich die Kammern kontrahieren und das Blut in den Kreislauf pumpen, und in die Diastole, bei der sich die Kammern entspannen und mit Blut füllen, eingeteilt. Der Großteil der Kammerfüllung wird durch den Ventilebenenmechanismus erzielt. Hierbei wird die Klappenebene während der Systole Richtung Herzspitze verlagert, welches einen Unterdruck in den Vorhöfen erzeugt und den venösen Rückstrom zum Herzen fördert. Nach Beendigung der Füllungsphase beginnt die Kontraktion der Kammern. Übersteigt der Druck in den Herzkammern den der nachgeschalteten Gefäße, öffnen sich die Taschenklappen und die Auswurfphase beginnt. Die Klappen schließen sich, sobald der Druck der Herzkammern wieder fällt [29].

## **1.2 Angeborene Herzfehler**

Herzfehler repräsentieren mit einer Inzidenz von 0,7% aller Neugeborenen die größte Gruppe der angeborenen Anomalien eines Organs [30]. Definitionsgemäß wird dabei von strukturellen Fehlbildungen des Herzens oder thorakalen Gefäßen gesprochen, die von potentieller oder funktioneller Signifikanz für die Sauerstoffversorgung aller Organe sind. Das Spektrum reicht von leichten Defekten, wie dem Vorhofseptumdefekt oder dem persistierenden Ductus arteriosus über mittelschwere Defekte, wie dem Ventrikelseptumdefekt, bis hin zu schweren Anomalien, wie dem Hypoplastischen Linksherzsyndrom oder der Pulmonalen Atresie. Diese gehen alle mit einer Vermischung von oxygeniertem und desoxygeniertem Blut einher [31]. So führen vor allem die schweren Herzfehler zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Sauerstoffversorgung aller Organe, weshalb sie auch als zyanotische Herzfehler bezeichnet werden. Betroffene Kinder benötigen eine dringliche chirurgische Intervention, da die Erkrankung unbehandelt zu einer Sterberate von 70% im ersten Lebensjahr führt [32-33].

### 1.2.1 Geschichtliche Entwicklung

Helen B. Taussig gilt als Begründerin der Kinderkardiologie. Sie legte, mit Hilfe jahrelanger Beobachtungen und Aufzeichnungen den Grundstein für die nichtinvasive Diagnostik der häufigsten angeborenen Herzfehlern [34]. Gemeinsam mit dem US-amerikanischen Chirurg Alfred Blalock entwickelte sie die Blalock-Taussig-Operation. Ziel dieses Verfahrens war es, über eine künstliche Umleitung, das Blut aus dem zyanotischen Kreislauf in die Lunge zu führen. Dadurch floss eine größere Menge Blut durch das Lungengewebe und steigerte somit den Anteil von oxygeniertem Blut. So konnten im Jahr 1944 Kinder mit einem zyanotischen Herzfehler erstmalig erfolgreich behandelt werden [35].

Die Erfassung angeborener Herzfehler erfolgte früher lediglich durch klinische Untersuchungen, die Diagnose konnte schließlich nur mithilfe einer Operation oder Autopsie gesichert werden. Heutzutage können Herzfehler sicherer mittels nicht invasiver Echokardiographie oder Angiographie erfasst werden. Im deutschen Herzbericht von 2016 wird belegt, dass die Sterberate herzkranker Kinder seit 1990 um 71% rückläufig ist und seit 2006 stagniert. Als Grund für die niedrigeren Sterberaten wird die verbesserte Bildgebung gesehen. Zusätzlich tragen die weniger invasiven OP-Verfahren, die hohe Qualität der heutigen Intensivmedizin und neuartige Herzkatheterinterventionen zu der gesunkenen Sterbeziffer bei [36].

### 1.2.2 Therapie bei angeborenen Herzfehlern

Herzfehler sollten so früh wie möglich diagnostiziert und wenn nötig zeitnah operiert werden. Die häufigste kardiogene Todesursache bei Neugeborenen (25%) ist das Hypoplastische Linksherzsyndrom. Dabei liegt eine Hypoplasie des linken Ventrikels, eine Hypoplasie der Aorta ascendens und eine Stenose der Mitral- und/oder Aortenklappe vor (Abb. 2A). Das desoxygenierte Blut wird aus dem rechten Vorhof durch einen Vorhofseptumdefekt mit oxygeniertem Blut aus dem linken Vorhof vermischt und durch die rechte Kammer in die Pulmonalarterie weitergeleitet. Ein Teil des Blutes, der über den Ductus arteriosus fließt, sorgt für eine systemische Zirkulation von mäßig oxygeniertem Blut [37]. Im Falle dieser schweren Anomalie kann die Normalisierung des Blutflusses mittels mehrerer aufeinander aufbauenden Operationen erreicht werden, die als Norwood-Operation zusammengefasst werden (Abb. 2B-D). Seitdem diese Prozedur 1971 zum ersten Mal durchgeführt wurde, hat diese Methode

einige Modifikationen erhalten. Die erste Operations-Stufe wird in den ersten Lebenstagen durchgeführt. Hierbei werden eine neue Aortenwurzel und ein neuer Aortenbogen konstruiert und der rechte Ventrikel mit der Aorta verbunden. Für die Lungendurchblutung erfolgt die Anlage eines Shunts zwischen der rechten A. subclavia und der rechten Pulmonalarterie (Abb. 2B). Diese Prozedur erfolgt unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine. Die zweite Operation nach einigen Monaten wird auch als Glenn-Anastomose (Hemi-Fontan) bezeichnet, welche zu einer Verbindung der V. cava superior mit der Arteria pulmonalis führt (Abb. 2C). Im letzten Schritt, etwa zwei Jahre später, wird eine extrakardiale cavopulmonale Anastomose angelegt (Abb. 2D). Hierbei wird das Blut der unteren Hohlvene durch eine Kunststoffprothese über die Pulmonalarterie in den Lungenkreislauf geleitet. Nach dieser Operation entwickeln sich die Kinder in der Regel gut [38]. Trotzdem ist das Ergebnis dieser Operationen noch nicht hinreichend zufriedenstellend. Die perioperative Mortalitätsrate ist die höchste aller, bei angeborenen Herzfehlern, durchgeführten Operationen und liegt zwischen 7% und 19% [39]. Zudem zeigte eine Analyse der Ressourcennutzung in den USA 2003, dass diese operative Therapie mit den höchsten Kosten aller Krankenhausgebühren bei Neugeborenen einhergeht. Sie liegen für das hypoplastische Linksherzsyndrom bei 200 000 Dollar [40-43]. Die hohe Sterblichkeit wird zum Teil mit der implantierten Kunststoffprothese assoziiert, sodass der Einsatz von neuartigen Prothesen auch in diesem Bereich erhebliche Vorteile bringen könnte (s.o.).

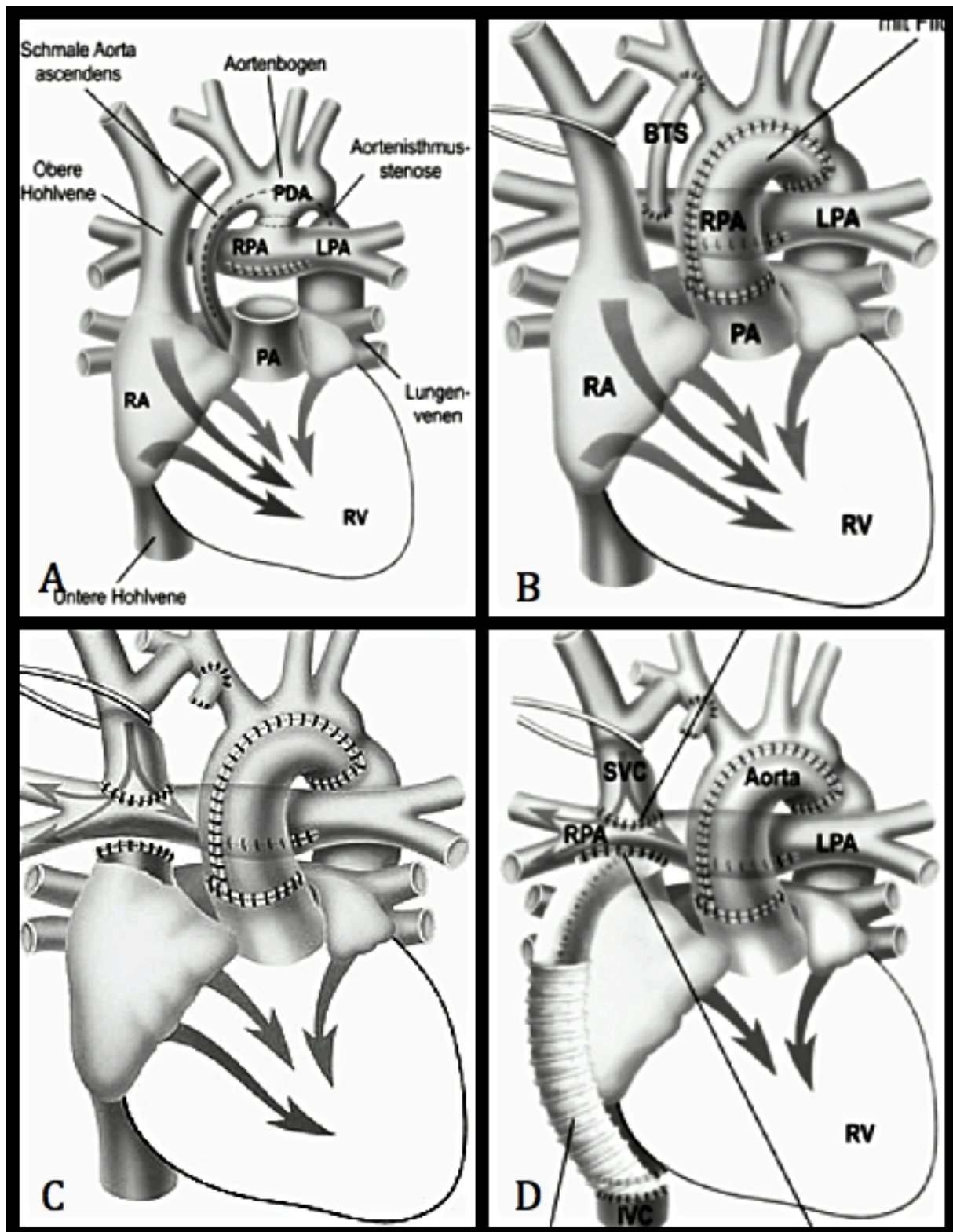


Abbildung 2: Darstellung der mehrstufigen Therapie des Hypoplastischen Linksherzsyndroms: (A) Bei einem Hypoplastischen Linksherzsyndrom liegt eine Hypoplasie des linken Ventrikels, eine Hypoplasie der Aorta ascendens und eine Stenose der Mitralklappe und/oder Aortenklappe vor; (B) Schritt 1 der Norwood-Operation verbindet die Pulmonalarterie mit dem zuvor erweiterten Aortenbogen; (C) Die Glenn-Anastomose führt als zweiter Schritt zu einer Verbindung zwischen der oberen Hohlvene und der Lungenarterie (RPA & LPA); (D) Im letzten Schritt wird ein extrakardialer Umgehungskreislauf angelegt: Eine Kunststoffprothese, die das Blut der unteren Körperhälfte direkt in den Lungenkreislauf leitet; Die Schritte von (C) und (D) entsprechen der Fontan-Operation [32, 37, 43] Bildquelle: [www.dhzb.de](http://www.dhzb.de)

### 1.3 Herzklappenerkrankungen

Herzklappenstenosen, wie auch Insuffizienzen sind die Folge struktureller Veränderungen des Klappengewebes, die durch degenerative, entzündliche oder traumatische Prozesse bedingt sind. Ein Klappenfehler kann jede der vier Herzklappen betreffen. Meistens sind allerdings die Klappen des linken Herzens betroffen, da hier eine größere Druckbelastung auf das Gewebe wirkt. Die Ursachen der Klappenvitien sind weltweit unterschiedlich. In Entwicklungs- und Schwellenländern spielt das häufiger vorkommende rheumatische Fieber, ausgelöst durch die Streptokokken der Gruppe A, noch immer eine große Rolle [7]. Hier kommt es durch eine Endokarditis und die dadurch bedingte Ablagerung von Antigen-Antikörper-Komplexen, vor allem auf der Mitralklappe, zu einer erworbenen Stenose [45, 46]. Dagegen ist die Inzidenz dieser Erkrankung in den Industrienationen im letzten Jahrhundert stetig gefallen. Hier ist der degenerative Vorgang im Sinne einer Verkalkung der Klappen, als Folge von früheren Infektionen, Bluthochdruck oder ein Klappenschaden als Folge eines Herzinfarktes die Hauptursache [49].

#### 1.3.1 Herzklappenstenose am Beispiel der Aortenklappenstenose

Die Herzklappenstenose ist eine pathologische Verengung und führt langfristig durch eine erhöhte Druckbelastung der vorgeschalteten Herzhöhle zu einer konzentrischen Hypertrophie. Die Aortenklappenstenose zählt mit der koronaren Herzkrankheit und der arteriellen Hypertonie zu den häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen der westlichen Welt [47, 48].

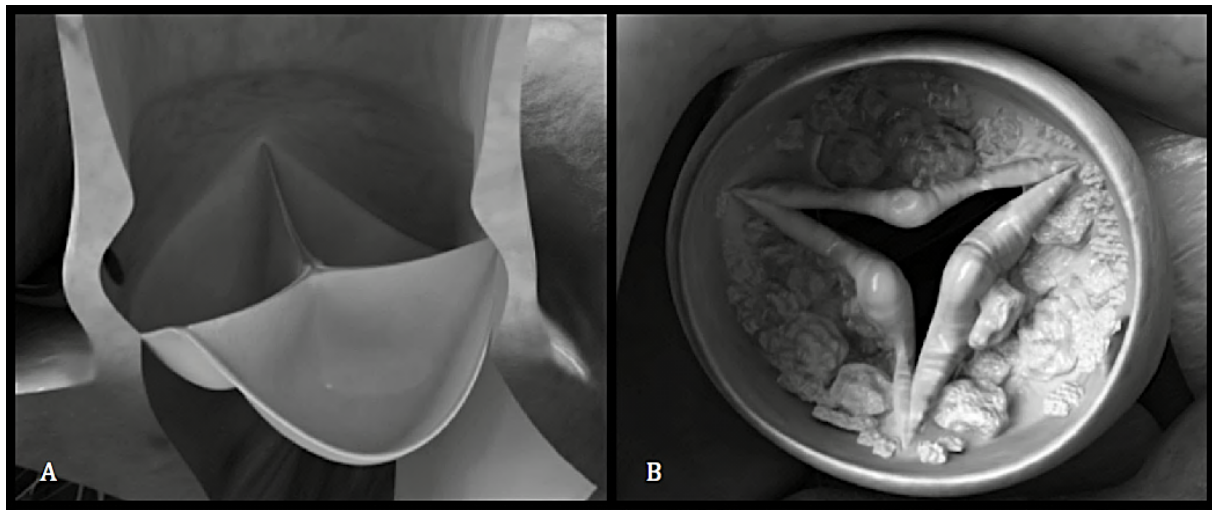
Die Aortenklappenstenose führt zu einer Obstruktion der linksventrikulären Ausflussbahn. Durch die verminderte Klappenöffnung kommt es zu einer unzureichenden Auswurfleistung des Herzens und zu einer Mehrbelastung des linken Ventrikels bis hin zur Linksherzinsuffizienz, die eine potentielle Lebensgefahr darstellt [9]. Sie verläuft zunächst lange Zeit asymptomatisch. Später kommt es zu den typischen Symptomen wie, Angina pectoris, belastungsabhängige Dyspnoe, und Schwindel bzw. Synkopen [49]. Eine symptomatische Stenose sollte rasch operativ versorgt werden. Für die Schweregradeinteilung der Stenose wird die echokardiographische Messung des mittleren und maximalen Druckgradienten über der Klappe verwendet. Ferner wird die mittels Kontinuitätsgleichung berechnete Aortenklappenöffnungsfläche zur Einteilung hinzugezogen. Eine schwere Aortenstenose wird unter der Voraussetzung eines normalen

Schlagvolumens wie folgt definiert: maximale Flussgeschwindigkeit  $> 4 \text{ m/s}$ , mittlerer Gradient  $> 50 \text{ mmHg}$  und zusätzlich Aortenklappenöffnungsfläche  $< 1,0 \text{ cm}^2$  (Tab. 1) [50].

Die Indikationen zur operativen Versorgung werden nach der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie primär bei symptomatischen Patienten mit einer schweren Aortenklappenstenose, also einem gewissen Schweregrad der Degeneration gestellt [9]. Bei asymptomatischen Patienten stellen Faktoren, wie eine verminderte systolische Pumpfunktion, ein hämodynamisch relevanter Progress, ventrikuläre Salven oder pathologische Belastungstests die Indikation zur Therapie [51].

Eine erkrankte Herzklappe kann minimal invasiv oder operativ behandelt werden. Ist eine Operation notwendig wird primär die Rekonstruktion der Herzklappe angestrebt. Sollte dies nicht gelingen, folgt der konventionelle Aortenklappenersatz (AKE), indem eine Herzklappenprothese implantiert wird. Allerdings stellt eine Operation mit extrakorporalem Kreislauf ein hohes Risiko für multimorbide Patienten dar. Bis vor einigen Jahren wurde bei Patienten mit einem hohen perioperativen Risiko auf einen AKE verzichtet [52]. Seit Einführung der kathetergestützten Aortenklappenimplantation, TAVI, können nun auch Hochrisikopatienten behandelt werden [53-55]. In einem interdisziplinären Team wird die Entscheidung zu einem offenen oder minimal invasiven Verfahren getroffen. Die Errechnung des perioperativen Risikos mittels Euro II-Score fließt mit in die Entscheidung ein [56, 57].





**Abbildung 3:** (A) Die Aortenklappe ist eine der vier Herzklappen und liegt am Ursprung der Aorta aus der linken Herzkammer. Als Taschenklappe besteht sie aus drei halbmondförmigen Taschen und verhindert den Blutrückfluss in der Diastole; (B) Eine Verengung wird als Aortenklappenstenose bezeichnet und führt zu einer Druckbelastung des linken Ventrikels. *Bildquelle: www.bvmed.de*

	leicht	mittel	schwer
<b>Maximale Aortenflussgeschwindigkeit (m/s)</b>			> 4,0
<b>Mittlerer Druckgradient (mmHg)</b>	< 25	20-25	> 50
<b>Aortenklappenöffnungsfläche (cm<sup>2</sup>)</b>	> 1,5	1,0-1,5	< 1,0

**Tabelle 1:** Einteilung der Schweregrade der Aortenklappenstenose [58]

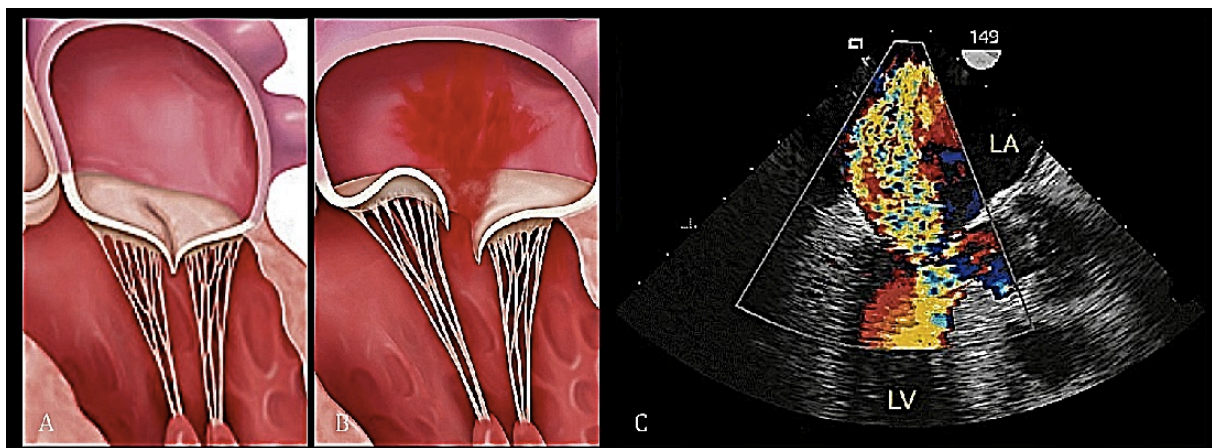
### 1.3.2 Herzklappeninsuffizienz am Beispiel der Mitralklappeninsuffizienz

Eine Klappeninsuffizienz bezeichnet die Schlussunfähigkeit der jeweiligen Klappe, welche zu einem Rückstrom von Blut durch diese Klappe führt. Insuffizienzen führen zu einer Volumenbelastung und damit zu einer Dilatation der vorgeschalteten Herzhöhle.

Derzeit leiden in Deutschland ca. eine Millionen Menschen an einer therapielevanten Mitralklappeninsuffizienz, welcher weltweit nach der Aortenklappenstenose der zweithäufigste Klappenfehler ist [59, 60]. Der häufigste Grund für dieses Vitium ist der Mitralklappenprolaps, wobei sich während der Kontraktion der Kammer Anteile des Klappenapparats in den linken Vorhof vorwölben. Dieser findet sich bei 2,4 % aller Menschen (Abb. 4B) [61]. Hierbei liegt primär ein angeborener Defekt des Segel- oder Sehnenfadengewebes zugrunde [62, 63].

Häufig werden die Patienten durch eine Abnahme der Leistungsfähigkeit, Belastungsdyspnoe und einen nächtlichen Husten symptomatisch. Bei einer akuten kardialen Dekompensation kommt es zur Ausbildung eines Lungenödems und einer darauffolgenden

Rechtsherzinsuffizienz. Für die Festlegung des Schweregrades stellt die Echokardiographie ein unverzichtbares Diagnoseinstrument dar (Tab. 2). Sie ist neben der Klärung der Ursache von entscheidender Bedeutung für Prognose und Therapieplanung [64]. Die Behandlung umfasst zum einen konservative Therapiemöglichkeiten und zum anderen operative oder interventionelle Maßnahmen. Die Entscheidung wird durch die Art des Klappenfehlers und Begleiterkrankungen beeinflusst. Bei einer schweren Insuffizienz wird nach Möglichkeit eine klappenerhaltende Rekonstruktion durchgeführt. Gelingt diese nicht, erfolgt ein Ersatz durch eine biologische oder mechanische Herzklappe [65].



**Abbildung 4:** (A) Die Mitralklappe ist eine der vier Herzklappen und befindet sich zwischen dem linken Vorhof und der linken Herzkammer. Sie verhindert während der Kammerkontraktion den Rückfluss des Blutes in den Vorhof; (B) Der Mitralklappenprolaps bezeichnet eine der häufigsten angeborenen Fehlbildungen des Klappenapparates; hierbei wölben sich Anteile der Mitralklappe während der Systole in den linken Vorhof vor. In 4 % der Fälle kommt es zu einer bedeutsamen Mitralklappeninsuffizienz, welche echokardiographisch diagnostiziert wird; (C) Der große gelbe Bereich im linken Vorhof (LA) stellt den Rückfluss des Blutes durch die Klappe dar *Bildquelle: www.klinikum.uni-muenchen.de*

	leicht	mittel	schwer
<b>Vorhofgröße (cm)</b>	$\leq 4,0$	$> 4,0$	$> 4,0$
<b>Jetfläche (cm<sup>2</sup>)</b>	$< 4,0$	4,0-8,0	$> 8,0$
<b>Regurgitationsvolumen (ml)</b>	$< 30$	30-59	$\geq 60$

**Tabelle 2:** Einteilung der Schweregrade der Mitralklappeninsuffizienz [64]

## 1.4 Herzklappenersatz

1960 wurde von dem Herzchirurgen Albert Starr und dem Ingenieur Miles Edwards die erste künstlich angefertigte Mitralklappe erfolgreich implantiert. Der Patient überlebte weitere zehn Jahre mit dieser neuen Klappe. Die, ebenfalls durch Starr und Edwards entwickelte, künstliche Aortenklappe konnte in Deutschland 1961 zum ersten Mal erfolgreich implantiert werden. Das Team um Albert Starr führte zwischen 1960 und 1997 ca. 4900 Operationen durch. Den französischen Herzchirurgen Alain Carpentier, Jean-Paul Binet und Carlos Duran gelang 1965 der Durchbruch in der Entwicklung von biologischen Herzklappen, indem sie einem Patienten erstmals die Herzklappe eines Schweins implantierten. 1971 setzte Marian Ionescu einem Patienten die erste Herzklappe eines Rinds ein, die auf einem Ring befestigt wurde und somit länger haltbar war. 2002 führte der französische Kardiologe Alain Cribier zum ersten Mal die Transkatheter-Aortenklappenimplantation (TAVI) durch. [66]

34.394 Herzklappenoperationen wurden 2018 in Deutschland durchgeführt. Davon nahm der Aortenklappenersatz mit 86% den größten Anteil ein, wohingegen die Mitralklappe bei Zwei Drittel der Patienten rekonstruiert werden konnte [15]. Für den Klappenersatz werden zurzeit biologische (Abb. 5A) oder mechanische Prothesen (Abb. 5B) eingesetzt. Ein großer Nachteil dieser beiden Klappen ergibt sich aus ihrer fehlenden Fähigkeit zu Wachstum und Remodelling. Vor allem für junge Menschen stellt diese Tatsache einen Nachteil dar [67].

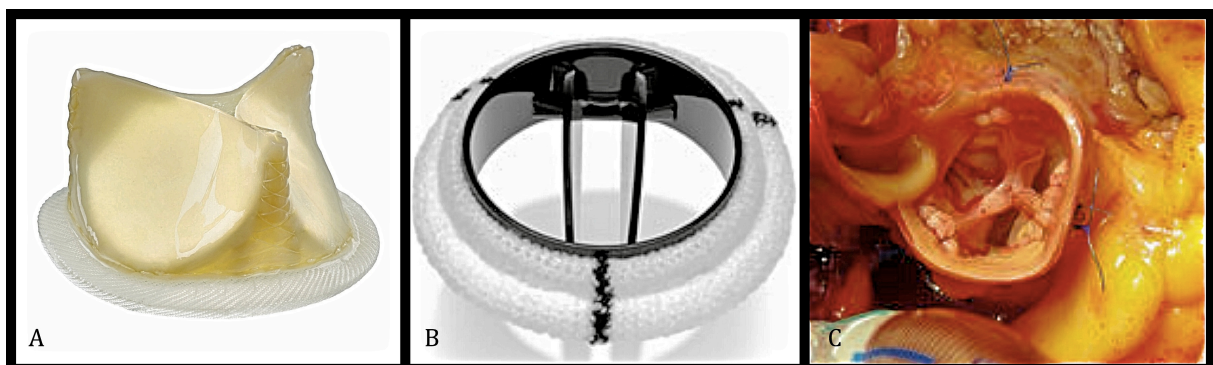
### 1.4.1 Mechanische Herzklappen

Das Innere der mechanischen Klappen besteht üblicherweise aus Pyrolytcarbon, der Nahring wird aus doppeltem Velour-Polyester hergestellt [68]. Von den verschiedenen mechanischen Herzklappen hat sich die Doppel-Flügel-Prothese durchgesetzt (Abb. 5B). Allen Prothesen gemeinsam ist das hörbare Klappengeräusch („Prothesenklick“), welches entsteht, wenn die Flügel auf den Ring der Klappe aufprallen. Mechanische Klappen zeichnen sich durch ihre lange Lebensdauer aus [69]. Allerdings haben die Klappen eine thrombogene Oberfläche und sind mit einem erhöhten Risiko für Thromboembolien assoziiert, sodass eine lebenslange Antikoagulation notwendig ist [68]. Die gefürchtetste Nebenwirkung der Antikoagulation ist die erhöhte Blutungsneigung dar, die beispielsweise zu einer Hirnblutung führen kann [70].

### 1.4.2 Biologische Herzklappen

Biologische Herzklappen werden aus xenogenem Gewebe (vom Schwein oder Rind) und anschließender chemischer Fixierung mit z.B. Glutaraldehyd hergestellt [71]. Hier besteht nicht die Notwendigkeit einer lebenslangen Einnahme von gerinnungshemmenden Pharmaka. Biologische Herzklappen haben jedoch im Vergleich zu mechanischen Klappen eine niedrigere durchschnittliche Lebensdauer von 10-20 Jahren [10]. Die Tendenz zur vermehrten Kalzifikation führt in 30% der Fälle zu einer erneut notwendigen operativen Versorgung nach ca. 15 Jahren. Die Tatsache, dass biologische Prothesen nach einer gewissen Zeit ersetzt werden müssen, erklärt, warum die Klappen meistens erst bei Patienten ab einem Alter von ca. 65 Jahren eingesetzt werden [11, 71].

Einen klinisch geringen Anteil aller implantierten Klappen nehmen die Autografts ein, also die Prothesen vom selben Individuum (Abb. 3C) [72]. Ein Beispiel hierfür ist die Ross-Operation, bei der jungen Erwachsenen und Kindern die Aortenklappe durch die körpereigene Pulmonalklappe ersetzt wird [73]. Die fehlende Pulmonalklappe wird im Gegenzug durch eine andere gespendete menschliche Pulmonalklappe (Homograft) ersetzt. Dies ist ein Beispiel für eine homologe Transplantation, bei dem Spender und Empfänger der gleichen Spezies angehören [74]. Auch bei den Auto- oder Homografts ist mit einem raschen Verschleiß zu rechnen, sodass dieses Verfahren ebenfalls eine erneute Operation nach sich zieht [75].



**Abbildung 5:** (A) Biologische Herzklappe „Trifecta™“ (Quelle: St. Jude Medical); (B) Zweiflügelige mechanische Herzklappe „SJM Regent™“ (Quelle: St. Jude Medical); (C) Autograft: eingenähte Pulmonalklappe in der Aortenwurzel Bildquellen <http://www.htchirurgie.uniklinikum-jena.de>, [www.herzzentrum-dresden.com](http://www.herzzentrum-dresden.com)

Die ideale Klappenprothese mit einer verlängerten Haltbarkeit sollte nachstehende Anforderungen möglichst vollständig erfüllen: Fähigkeit zu Wachstum und Infektionsabwehr, vollständiger Klappenschluss, Vermeidung von Thrombenbildung und eine lebenslange

Haltbarkeit [76]. Um diesen Ansprüchen nachzukommen, wurden in den vergangenen Jahren zwei grundlegende Konzepte entwickelt: zum einen beruht der Ansatz des TEs darauf, in vitro gezüchtete, autologe Zellen auf synthetische oder biologische Strukturgerüste zu siedeln und diese anschließend in einem Bioreaktor zu einer funktionsfähigen Klappe oder Prothese heranwachsen zu lassen [77]. Zum anderen ist es möglich, dezellularisierte Herzklappen oder auch synthetische Polymere in den Körper zu implantieren und diese dann in-vivo durch eigene Zellen besiedeln zu lassen [78].

## **1.5 Herz-Lungen-Maschine**

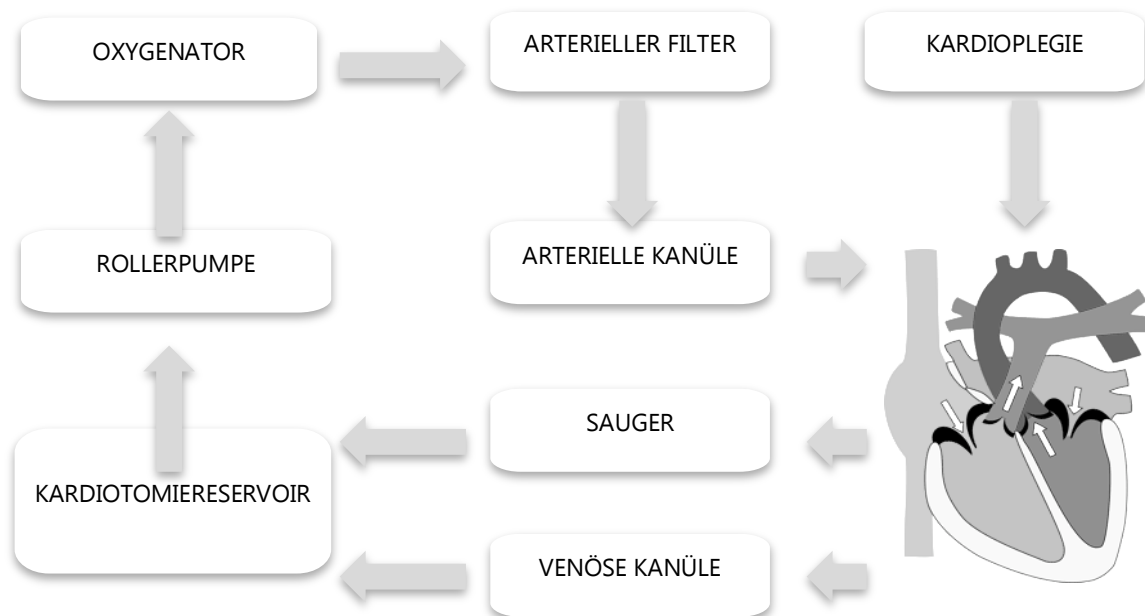
Die Herz-Lungen-Maschine (HLM) ersetzt während der Operation am offenen Herzen sowohl die Oxygenierungsfunktion der Lunge als auch die Pumpfunktion des Herzens. Sie ermöglicht dadurch die Stilllegung des Herzens während des Operationszeitraums und hält gleichzeitig die Perfusion des Körpers mit oxygeniertem Blut aufrecht.

Die erste Herz-Lungen-Maschine wurde 1855 von dem deutsch-österreichischen Physiologen Maximilian von Frey zusammen mit seinem Kollegen Max Gruber entworfen und gebaut [79]. Später wurde mit Heparin das Fundament für den Einsatz der HLM am Menschen gelegt, welches 1916 von dem Chirurgen Jay McLean als eine gerinnungshemmende Substanz aus der Hundeleber isoliert wurde. 1953 gelang dem US-amerikanischen Chirurg und Erfinder John Heysham Gibbon Junior, der als Vater der Herz-Lungen-Maschine bezeichnet wird, eine Operation am offenen Herzen mit extrakorporaler Unterstützung [80]. Bei diesem Eingriff wurde ein Vorhofseptumdefekt einer 18-jährigen Frau verschlossen [81]. In der weiteren zeitlichen Entwicklung wurde, um den Sauerstoffverbrauch der Organe zu senken, zunächst das Prinzip der Hypothermie eingeführt, bis schließlich 1955 die Entwicklung eines Oxygenators gelang [82]. In Deutschland setzte Rudolf Zenker daraufhin 1958 die durch Hans-Georg Borst entwickelte HLM erfolgreich bei der operativen Versorgung einer jungen Patientin mit Ventrikelseptumdefekt ein [83].

Die Herz-Lungen-Maschine besteht aus einer venösen Ableitung aus dem Patientenkörper, einem Reservoir, einer Rollerpumpe, einem Membranoxygenator mit Gas- und Wärmeaustauschfunktion, einem arteriellen Filter und einem arteriellen Zugang. Das Blut wird über eine venöse Kanüle im rechten Vorhof oder der V. cava drainiert und über eine Leitung der Schwerkraft folgend in einem Reservoir gesammelt (Abb. 6). Das aus dem Operationsgebiet abgesaugte Blut drainiert ebenfalls in das Reservoir, welches einen

Entschäumer und einen Partikelfilter enthält, um das Blut von Geweberesten zu befreien. So kann dem Patienten das gesäuberte Blut wieder zugeführt werden. Das Blut wird dann mit Hilfe einer Rollerpumpe zum Gas- und Wärmeaustausch in einen Oxygenator geleitet. Im Anschluss wird das Blut in die Aorta ascendens zurückgepumpt [83, 84].

Bei minimalinvasiven Operationen wird die HLM in der Regel an die Leistengefäße angeschlossen [85].



**Abbildung 6: Schema einer extrakorporalen Zirkulation: Blut fließt über eine venöse Kanüle aus der V. cava oder der rechten Ventrikel in das Kardiotomiereservoir und wird dort gesammelt. Zusätzlich wird über einen Sauger das überschüssige Blut aus dem operativen Gebiet in das Kardiotomiereservoir geleitet, wo es gesäubert und ebenfalls gespeichert wird. Dann wird das Blut über eine Rollerpumpe für den Gas- und Wärmeaustausch in den Oxygenator geleitet. Im Anschluss wird das Blut in einem Filter von Luftblasen befreit, um Mikroembolien zu verhindern. Die Rückführung erfolgt über die Aorta ascendens. Es besteht ein separates System für die Kardioplegiegabe. Bildquelle (Herz): <http://www.kinderherzpraxis-linz.at/fragen.html>**

## 1.6 Tissue Engineering

Tissue Engineering (TE) ist im World Technology Panel 2002 definiert worden als *„Gemeinsame Applikation von Prinzipien und Methoden des Engineering und der Biowissenschaften für das Erreichen von fundamentalen Einsichten in die Verhältnisse zwischen Struktur und Funktion bei neuartigen und pathologischen Geweben, sowie die Entwicklung der biologischen Ersatzmaterialien zur Rekonstruktion, Erhaltung oder Verbesserung der Gewebefunktion“* [übersetzt aus dem Englischen ; 86].

Da die meisten operativen kardiovaskulären Behandlungen den Ersatz von Gewebe vorsehen, kann das TE bei der Therapie dieser Erkrankungen eine große Rolle spielen [87]. Dank weitreichender Fortschritte in der Stammzellforschung, der Materialkunde und in-Vitro-Assay Technologien wird die klinische Anwendung von künstlich hergestellten kardiovaskulären Geweben zu einer realistischen Therapie der nahen Zukunft [88]. So wurden bereits viele Herangehensweisen für die Gewebezüchtung mit embryonalen, postembryonalen, adulten Stammzellen und differenzierten Zellen evaluiert.

### 1.6.1 Anfänge des Tissue Engineerings

Nach Erfindung des Mikroskops prägte Robert Hooke als erster den Begriff der Zelle und veröffentlichte seine Erkenntnisse in seinem Buch Micrographia [89]. 1838-1839 definierten Matthias Schleiden und Theodor Schwann die Zelltheorie. Darunter fanden sich die zentralen Aussagen, dass alle Organismen aus einer oder mehreren Zellen bestehen, Zellen stets aus anderen Zellen durch Zellteilung entstehen und diese die grundlegende Einheit für die Struktur der Organismen sind [90]. 1858 erweiterte Rudolf Virchow diese These und veröffentlichte die Theorie der Zellulärpathologie, die besagt, dass Krankheiten auf der Störung von Körperzellen basieren [91]. Alexis Carrel zeigte 1913, dass Zellen, die aseptisch gehalten und ernährt werden, auch über eine längere Zeit in einer Zellkultur wachsen können [92].

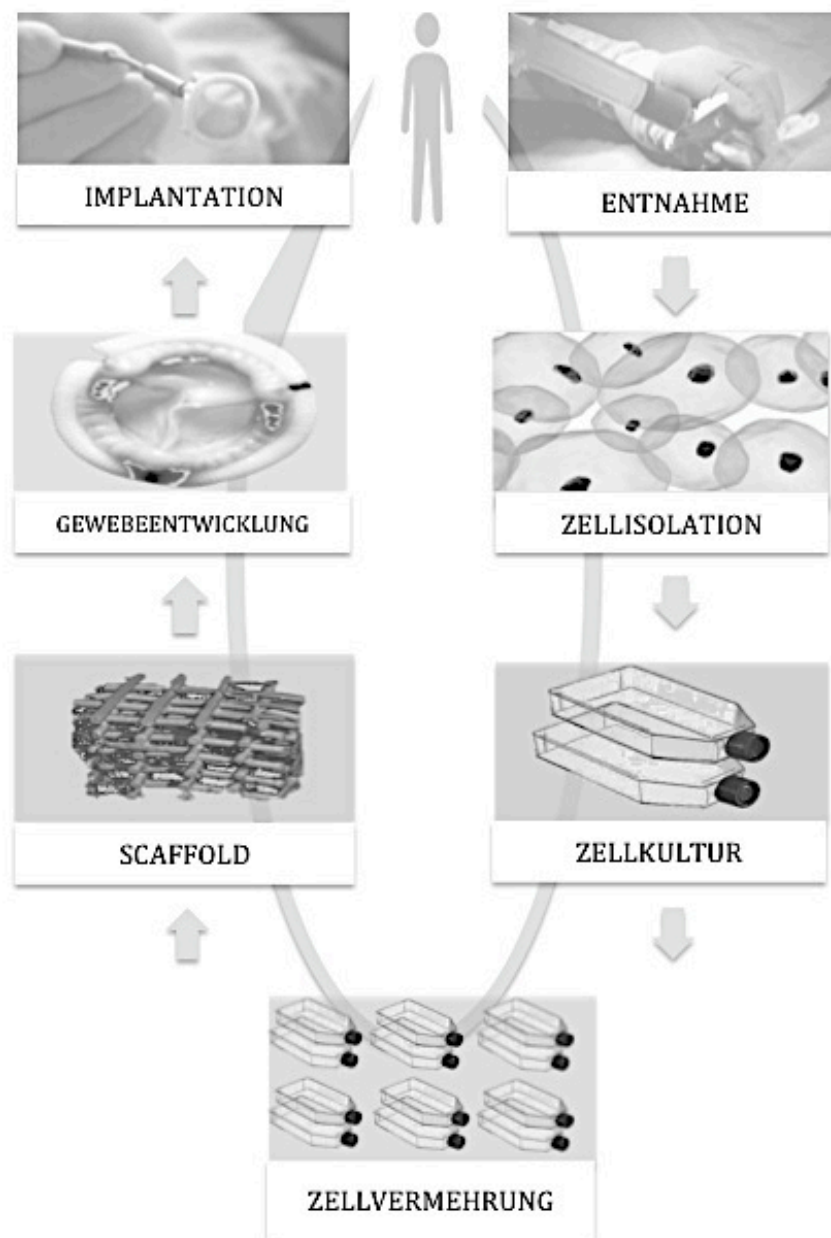
Die ersten künstlich hergestellten Konstrukte der Haut wurden von Howard Green an der Harvard Medical School entwickelt [93]. Die Geburtsstunde des TEs ist in den 1980 er Jahren den beiden Ärzten Joseph P. Vacanti und Robert Langer zuzuordnen. Sie nutzten eine Maus als Bioreaktor, um Knorpelgewebe in Form eines menschlichen Ohrs anzuzüchten [94]. In den darauffolgenden Jahren beschäftigten sich zahlreiche Forschungslaboratorien mit der Anwendung von TE für fast jedes Gewebe im menschlichen Körper [95].



### 1.6.2 Prinzipien des Tissue Engineerings

Tissue Engineering (TE) basiert auf der grundsätzlichen Idee, aus Zellen ein funktionales Gewebe oder Organe herzustellen [96]. Die verwendeten Zellen können von einem autologen (zu demselben Individuum gehörig), homologen (zur selben Spezies gehörig) oder xenogenen (von einer anderen Spezies) Spender stammen. Idealerweise werden körpereigene Zellen verwendet, um mit dem resultierenden Gewebe die erkrankten Organe teilweise oder sogar ganz zu ersetzen. Nach der Entnahme des Spendergewebes (z.B. mittels Biopsie) werden die Zellen isoliert und anschließend mit einem entsprechenden Medium kultiviert (Abb. 7). Die vermehrten Zellen werden dann auf dreidimensionale Zellträger ausgesät. Hier macht man sich dreidimensionale Zellträger zu Nutze, die entweder aus biologischen oder synthetischen Materialien hergestellt werden [97]. Diese Zellträger aus resorbierbarem Material fungieren, vor allem zu Beginn des Gewebewachstums, als Formgeber. Das Trägermaterial bietet eine mechanische Unterstützung, bis die Zellen ihre eigenen Matrixproteine produzieren. Es kann je nach Eigenschaft nach Aufbau einer funktionstüchtigen extrazellulären Matrix vollständig resorbiert werden. Bei hoher physikalischer Belastung ist allerdings nach der Resorption des Trägermaterials keine ausreichende eigene Stabilität gewährleistet. Im Gegensatz dazu zeichnen sich die nicht resorbierbaren Materialien durch ihre gleich bleibende physikalische Belastungsfähigkeit aus [98, 99]. Die Entwicklung eines funktionsfähigen Gewebes kann unter Einfluss mechanischer Reize in Bioreaktoren stattfinden. Hier werden in-vivo-Bedingungen künstlich nachgeahmt, indem die hergestellte Prothese mechanischen Reizen (Fluss, Druck, Dehnung und Kompression) ausgesetzt wird. Außerdem wird das Gewebe mit Sauerstoff, Zellkulturmedium und im Medium enthaltenen Wachstumsfaktoren versorgt. Im Anschluss wird das hergestellte Gewebe in den Empfänger implantiert [100].





**Abbildung 7: Systematischer Überblick über das Konzept des Tissue Engineerings: Nach der Entnahme von Spendergewebe werden die Zellen isoliert und anschließend in geeignetem Medium kultiviert. Im weiteren Verlauf erfolgt die Vermehrung der Zellen, mit denen anschließend dreidimensionale Gerüste besiedelt werden. Die Entwicklung eines funktionsfähigen Gewebes findet unter Einfluss mechanischer Reize und Wachstumsfaktoren statt. Im Anschluss wird das hergestellte Gewebe in den Spender implantiert.**  
*[Bildquelle: 101-104]*

### 1.6.3 Zellen für kardiovaskuläres Tissue Engineering

#### *Embryonale Stammzellen:*

Embryonale Stammzellen (ESC) können sich in jegliche Zelltypen (des Lebewesens) entwickeln. Lange Zeit galten ESCs, hinsichtlich ihrer klinischen Anwendung, als ungeeignet. Durch ihre Omnipotenz gelangten sie allerdings in den Mittelpunkt der medizinischen Forschung. So war es bereits möglich, aus ESC beta-Zellen des Pankreas, Kardiomyozyten und Osteoblasten zu entwickeln [105-107]. In Bezug auf die kardiovaskuläre Forschung ist es gelungen, diese Zellen zu funktionellen Herzklappen oder Gefäßprothesen heranzuzüchten [108, 109]. Differenzierte Kardiomyozyten könnten die Kontraktilität von infarziertem Herzgewebe wiederherstellen. Es ist allerdings auch bekannt, dass unkontrollierte Differenzierung in Kardiomyozyten zu kardialen Teratomen und zu einem Anstieg der immuninflammatorischen Antwort, vor allem in infarziertem Gewebe, führt. So bleibt ihre sichere Anwendung weiterhin eine Herausforderung [110, 111]. Auch wird weiterhin die Gewinnung und somit die Verwendung der ESCs kontrovers diskutiert, da es ethisch-moralische Bedenken aufwirft [112].

#### *Adulte Stammzellen:*

Zu der Gruppe der postembryonalen, adulten Stammzellen gehört jede Form der Stammzelle, die nach dem Abschluss der Embryonalentwicklung im Körper vorhanden ist. Adulte Stammzellen können sich nicht mehr in jede beliebige Zelle differenzieren. Durch ihre eingeschränkte Plastizität werden sie als multipotent bezeichnet. Hinzu kommt eine eingeschränkte Verfügbarkeit aufgrund der geringeren Zellzahl im Gewebe. Zusätzlich spielt auch hier die potentielle Gefahr einer Entartung der Zellen eine Rolle [113-117]. Während der gesamten Lebensdauer eines Organismus lassen sich adulte Stammzellen in Organen wie Knochenmark und Fettgewebe nachweisen. Da diese Zellen in jedem Organismus verfügbar sind, bietet sich deren Einsatz für das TE an.

#### *Nabelschnurstammzellen:*

Als Quelle junger, undifferenzierter adulter Stammzellen wurde bereits die erfolgreiche Isolation von Vorläuferzellen aus dem Blut der Nabelschnur und aus der Amnionflüssigkeit beschrieben. Sodian et al. züchteten aus derartig gewonnenen Zellen vitale und

funktionsfähige Herzklappen [118, 119]. Die Möglichkeit der Kryokonservierung von Nabelschnurblutstammzellen in Stammzellbanken bietet das Potential der lebenslangen Therapiemöglichkeit von beispielsweise angeboren Herzfehlern oder malignen hämatologischen Erkrankungen [120, 121].

#### *Stammzellen aus dem Knochenmark:*

Hämatopoetische Stammzellen (HSC) aus dem Knochenmark, die die Oberflächenmarker CD34 und CD133 exprimieren und die davon abgeleiteten endothelialen Vorläuferzellen (EPC), nehmen einen hohen Stellenwert im Bereich des TE ein [122, 123]. Nach aktuellem Forschungsstand bietet die intramyokardiale Stammzelltherapie im Hinblick auf die Verwendung dieser Zellen bereits ein vielversprechendes Konzept: CD133-positive Stammzellen werden in das Myokard injiziert und bewirken eine beschleunigte Regenerationszeit des Herzmuskels [124].

#### *Induzierte pluripotente Stammzellen:*

Ferner wurde 2006 von Takahashi und Yamanaka erstmalig die Herstellung autologer pluripotenter Stammzellen aus körpereigenen somatischen Zellen beschrieben [116]. Durch die Überexpression von vier Transkriptionsfaktoren wurden unipotente Zellen in pluripotente Stammzellen reprogrammiert, die die Fähigkeit zur Differenzierung in Zellen aller drei Keimblätter besitzen. Der retrovirale Gentransfer und die, damit verbundene, Veränderung des Empfänger-genoms ist jedoch unter der aktuellen Gesetzeslage verboten. Zudem wurde unter heranwachsenden induziert pluripotenten Zellen ebenfalls die Entwicklung bösartiger Tumore beobachtet [125-127].

#### *Differenzierte Zellen:*

Ausdifferenzierte Zellen hingegen besitzen keine Differenzierungsfähigkeit mehr. Im Bereich der kardiovaskulären Forschung handelt es sich in diesem Falle vor allem um somatische Zellen, die aus Fragmenten venöser oder arterieller Gefäße nach einer herzchirurgischen Operation gewonnen werden können. Diese etablierte Isolationsmethodik und Verwertung von Geweberesten nach der Operation spricht für den Einsatz dieser Zellen. Trotzdem ist es in den meisten Fällen nicht möglich, den Patienten größere Zellmengen zu entnehmen und der oft schlechte Gefäßzustand erklärt die teilweise niedrigen Proliferationsraten der Zellen [76,

87, 128]. Trotzdem wurden unter Verwendung der Zellen erfolgreich Prothesengerüste besiedelt und zu funktionsfähigen Klappen herangezüchtet. Sowohl Zellen aus dem Gewebe von Venen als auch Arterien zeigten exzellente Entwicklungsfähigkeiten [129-131].

#### *Endotheliale Vorläuferzellen:*

Endotheliale Progenitorzellen (EPC) wurden 1997 erstmals beschrieben und sind seitdem Gegenstand zahlreicher Untersuchungen [132]. Sie werden während einer kardiovaskulären Schädigung freigesetzt und sind bei der Reparatur von Gefäßen von Bedeutung. Es konnte nachgewiesen werden, dass Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, darunter die endothelialen Vorläuferzellen, durch jegliche Auslöser vaskulären Stresses, wie Polytrauma oder Anlage eines kardiopulmonalen Bypasses mobilisiert werden [24, 133]. Noch immer ist ihre genaue Funktion unklar. Es ist allerdings bekannt, dass die Zahl der zirkulierenden EPCs im Blut zur Bestimmung des kardiovaskulären Risikos herangezogen werden kann [134].

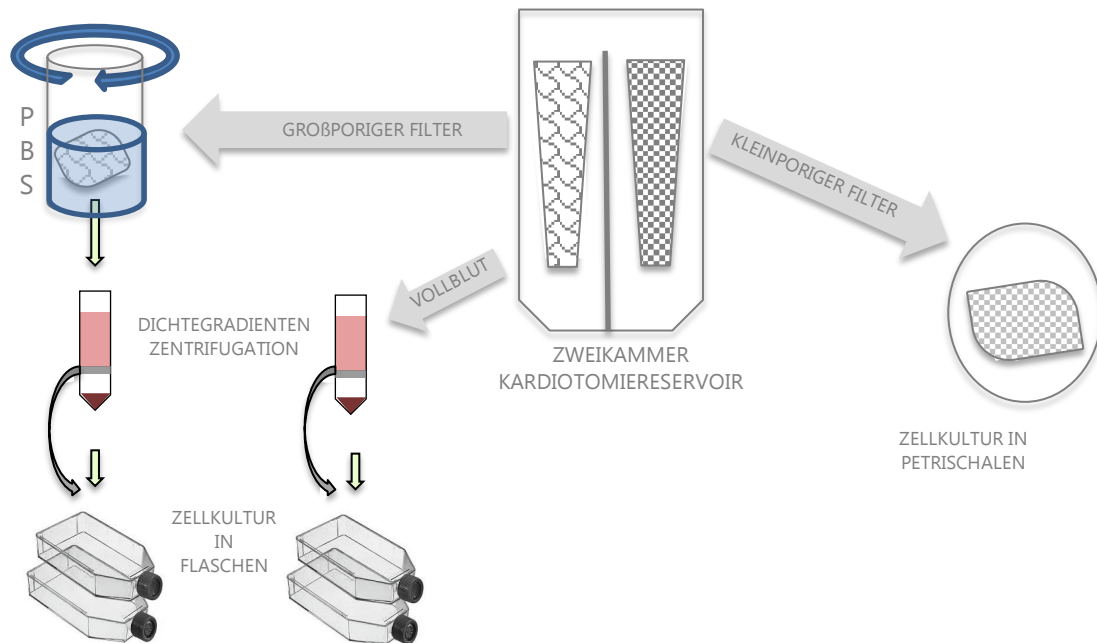
## **2 Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv**

Die Spender (n=10) wurden irreversibel anonymisiert und aus dem Patientenkollektiv der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der LMU München entnommen. Frische Vollblutproben und Filter wurden während und nach einer herzchirurgischen Operation aus dem Kardiotomiereservoir (Inspire™ HVR Dual; Sorin Group Deutschland GmbH, München, GER) entnommen. Lebensalter der Patienten und Zeit der extrakorporalen Zirkulation wurden dokumentiert. Die Operationszeit von  $t < 150$  min wurde nicht in die Studie integriert. Dadurch konnte eine möglichst lange Zeit an der Herz-Lungen-Maschine garantiert werden. Zusätzlich erfolgte die Berechnung des EuroSCORES II. Für die Verwendung der Vollblutproben und der Kardiotomiereservoirs liegt eine Unbedenklichkeitsbescheinigung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München vor. Ebenfalls liegt eine Unbedenklichkeitsbescheinigung für die Zellisolation aus Venenfragmenten der V. saphena der Kontrollgruppe vor (siehe Anhang).

### **2.2 Zellisolation aus Bestandteilen des Kardiotomiereservoirs**

Die Isolierung der Endothelzellen (EC) und Fibroblasten (FB) erfolgte sowohl aus dem Vollblut, welches während der herzchirurgischen Operation aus dem KR entnommen wurde, als auch aus den zwei verschiedenen, im KR vorhandenen Filtern. Der feinporige Filter wurde aus der venösen Sektion des Reservoirs entnommen und direkt in einer Petrischale kultiviert. Der großporige Filter stammte aus der Kardiotomiesektion des KR und wurde mit Flüssigkeit gespült, um die Zellen in einer Suspension weiter zu isolieren (Abb. 8).



**Abbildung 8: Systematischer Überblick über die verschiedenen Isolationsmethoden, die in der Arbeit angewandt wurden. Die Entnahme von Vollblut erfolgte während der Reperfusion aus dem Kardiotomiereservoir. Die frisch entnommenen Blutproben wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation separiert und mononukleäre Zellen isoliert. Das gleiche Verfahren wurde auf die großporigen Filter aus der Kardiotomiesektion des Reservoirs angewandt. Der Unterschied bestand darin, dass diese vorher gespült wurden, um die gewünschten Zellen in eine flüssige Suspension zu bekommen. Die kleinporigen Filter aus der venösen Sektion des Reservoirs wurden auf die passende Größe zugeschnitten und in Petrischalen direkt kultiviert.**

### 2.2.1 Zellisolation aus dem Vollblut

Die Isolierung von mononukleären Zellen erfolgte aus dem Blut, das während der herzchirurgischen Operation gewonnen wurde. 20 ml Blut wurde während der Operation aus dem KR entnommen. Der genaue Abnahmezeitpunkt wurde auf  $t=15$  min nach Beginn der Reperfusion festgelegt. Die Reperfusion bezeichnet die unterstützende Pumpfunktion der HLM bei wieder aktivem Herzschlag bis zur Beendigung des extrakorporalen Kreislaufes. Da die Reperfusionszeit in der Regel der Hälfte der Ischämiezeit des Herzens entspricht, stellte dieser Entnahmezeitpunkt eine ausreichende Länge der Operation dar und schloss somit alle kürzeren OPs aus [135]. Das Material wurde gekühlt transportiert und die sofortigen Verarbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen unter der Laminar Flow Werkbank (Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, GER).

Das Blut wurde zuerst mit Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; Biochrom AG, Berlin, GER) im Verhältnis von 1:1 verdünnt. Daraufhin erfolgte die Herstellung eines Buffy Coats, wofür das

verdünnte Blut für  $t=10$  min bei 400 g zentrifugiert wurde. Das Plasma wurde abgesaugt und verworfen und die Leukozytensuspension (Buffy Coat) vorsichtig vom Erythrozytenpellet abgetragen und zur Weiterverarbeitung in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon, Corning Inc., Corning, USA) gegeben. Da die gewonnenen Zellen noch nicht vollständig von den Erythrozyten getrennt wurden, musste in einem weiteren Schritt die Trennung dieser beiden Blutbestandteile mittels Dichtegradientenzentrifugation erfolgen.

Der Buffy Coat wurde dafür mit Earle's Medium 199 (M199; Biochrom AG) im Verhältnis von 3:1 verdünnt. 15 ml der Biocoll Separating Solution (Biochrom AG) mit einer Dichte von 1.077 g/ml wurde in einem 50 ml Röhrchen vorgelegt und 35 ml der verdünnten Zellsuspension vorsichtig darauf gegeben. Dabei war es besonders wichtig, dass die Suspension langsam am Rand des Röhrchens nach unten lief, um eine Vermischung mit dem Trennmedium zu vermeiden. In einem weiteren Schritt wurde das Röhrchen für  $t=30$  min bei 440 g zentrifugiert.

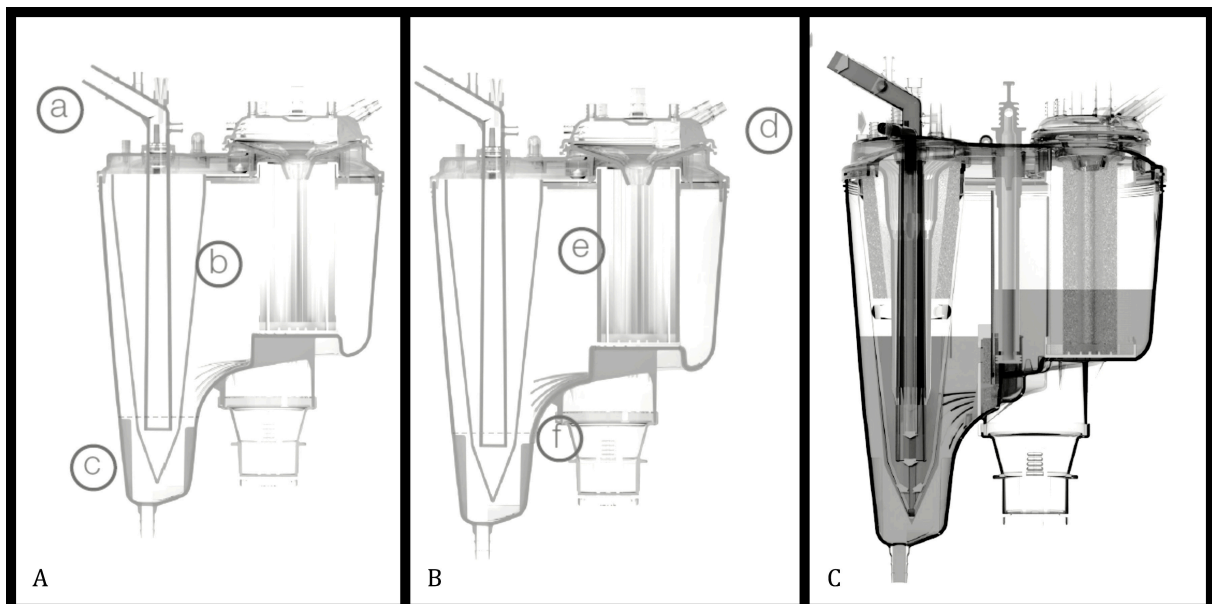
Im Anschluss erfolgte die Absaugung des M199 Überstands bis circa 1 cm über dem sichtbaren Ring von mononukleären Zellen. Im Anschluss wurde die Interphase, also das Gemisch aus mononukleären Zellen abgetragen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die nächsten Schritte beinhalteten ein zweimaliges Spülen bzw. Waschen der gewonnenen Zellen mit M199 Medium. Dafür wurde im ersten Schritt die gespülte Zellsuspension für  $t=10$  min bei 440 g zentrifugiert und nach dem Spülen im zweiten Schritt für  $t=5$  min bei 440 g zentrifugiert.

Die Aufnahme der gewonnen Zellen geschah in 2 ml M199. Davon wurde 1 ml in eine T12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflasche (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER) mit 4 ml Endothelial Cell Growth Medium (ECGM; Promocell GmbH, Heidelberg, GER) überführt. Die Zugabe der verbleibenden Menge in eine T12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflasche erfolgte mit 4 ml Fibroblast Cell Growth Medium (FGM; Promocell GmbH). Die Zellen wurden bei 37° C / 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Ein Mediumwechsel und mikroskopische Evaluation des Zellwachstums fand alle zwei Tage statt.

### 2.2.2 Isolation aus Filtern des Kardiotomiereservoirs

Die verwendeten Filter entstammten dem Kardiotomiereservoir der Firma Sorin mit dem Modellnamen Inspire™ 8 (Abb. 9). Das KR wurde nach Beendigung der herzchirurgischen Operation vollständig von den restlichen Geräten der Herz-Lungen-Maschine entfernt. Die Schläuche wurden steril abgeklemmt, um eine kontaminationsfreie Verarbeitung zu gewährleisten.

Der Transport unter die sterile Werkbank erfolgte in einem geschlossenen Behälter und möglichst zügig, um die Austrocknung der Filter zu verhindern. Unter der sterilen Werkbank wurde das KR aufgehiebelt.



**Abbildung 9:** Kardiotomiereservoir (Sorin Inspire TM 8) mit der venösen Sektion des Reservoirs (A) und einem Fassungsvermögen von max. 4500 ml und der Kardiotomiesektion des Reservoirs (B): (a) venöser Rückfluss, (b) dualer Netzfilter (inneres Filterblatt mit Porengröße 41 µm und äußeres Filterblatt mit Porengröße 120 µm), (c) spezielle Auskleidung, die Luftblasen nach oben befördern, (d) Eintritt des abgesaugten Blut aus dem Operationsbereich, (e) großporiger Tiefenfilter mit 41 µm Porengröße, (f) divergente Rippen auf Boden des Reservoirs, um Geschwindigkeit des Blutflusses zu reduzieren *Bildquelle: Produktdatenblatt Sorin INSPIRE TM 8; Livanova 2016*



#### *Isolation aus feinporigen Filternetzen:*

Die venöse Sektion des KRs beinhaltet einen dualen Filter mit einer inneren Porengröße von 41 µm und einer äußeren von 120 µm. Die doppelten Filternetze wurden nach Möglichkeit zusammengelassen, in ein Gefäß mit etwas M199 Medium gegeben und vorsichtig gespült, sodass sich die Erythrozyten lösten.

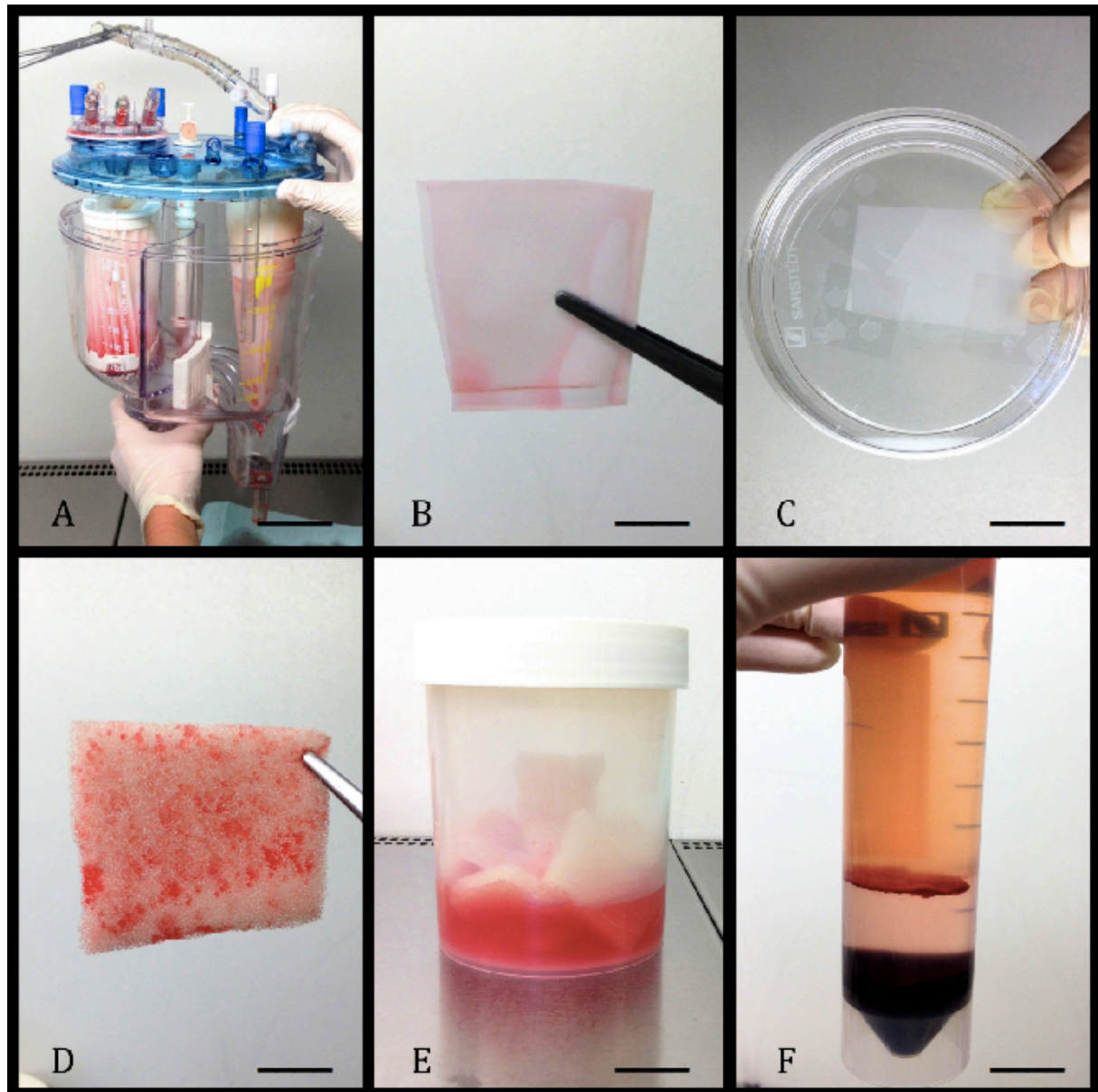
Im Anschluss wurden die Filter auf eine passende Größe (5 x 5 cm) zugeschnitten und in eine Petrischale (92 x 16 mm; Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, GER;) gelegt (Abb. 10B+C). Die Ecken wurden beschwert, sodass die Filter nicht frei im Medium schwammen und die Zellen einfacher auf dem beschichteten Boden anwachsen konnten. Dafür wurden Tupfer von sterilem Silikon (Dow Corning Inc., Midlands, USA) auf dem Boden der Petrischale verteilt, wodurch die Deckgläser für die Mikroskopie (24 x 24 mm; Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, GER) haften konnten. Nach Zugabe von 12 ml des jeweiligen Mediums (Endothelial Cell Growth Medium oder Fibroblast Cell Growth Medium) wurden die Zellen bei 37°C / 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Ein Mediumwechsel und mikroskopische Evaluation des Zellwachstums erfolgte alle zwei Tage.

#### *Isolation aus großporigen Filternetzen:*

Im nächsten Schritt erfolgte die Isolation der Zellen aus den Filtern der Kardiotomiesektion des Reservoirs. Der Tiefenfilter (Schaumstofffilter) aus der Absaugesektion und der Filter zwischen den beiden Sektionen wurden aus den Fassungen entfernt und in kleinere Teile geschnitten (Abb. 10D). Danach wurden diese in einen Plastikbecher gegeben und mit *M199* Medium gespült (Abb. 10E).

Dieser Behälter wurde dann für t=10 min bei 25°C mit einer Frequenz von 60 U/min geschüttelt, um die Zellen vom Filter zu lösen und in einer flüssigen Suspension mit der Isolation fortzufahren. In einem weiteren Schritt wurde das Medium-Zellgemisch nach zusätzlichem manuellen Spülen der Filter in Zentrifugenröhrchen übertragen. Dabei war es wichtig, dass die Schaumstofffilter durch die verwendeten Pipetten gründlich ausgepresst wurden, um die Flüssigkeit vollständig abzunehmen. Im Anschluss wurden die Röhrchen für t=5 min bei 500 g zentrifugiert. Die darauffolgenden Schritte stimmten mit der Vorgehensweise bei der Isolierung von Zellen aus dem Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation überein (Abb. 10F).

Zusammenfassend wurden mit den Blutbestandteilen und Filternetzen eines KRs jeweils zwei Kulturflaschen Endothelzell- sowie Fibroblastenmedium angelegt. Zusätzlich erfolgte eine direkte Kultivierung der feinporigen Filtermembran in zwei Petrischalen, mit ebenfalls beiden Medien.



**Abbildung 10: (A) Geöffnetes Kardiotomiereservoir (Sorin Inspire™ 8) (B) Filter der venösen Sektion des Reservoirs; (C) Dualer Filter der venösen Sektion in der Petrischale (inneres Filterblatt mit Porengröße 41 µm und äußeres Filterblatt mit Porengröße 120 µm); (D) großporiger Filter (Schaumstofffilter) der Kardiotomiesektion; (E) Schaumstofffilter werden in einen Plastikbehälter platziert und mit M199 Medium gespült; (F) Trennung der Erythrozyten von gewünschten Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation.**

### 2.2.3 Isolation von Endothelzellen und Fibroblasten aus der Vene

Als Kontrollgruppe fungierten die enzymatisch aus Venenfragmenten der V. saphena magna abgelösten Endothelzellen und Fibroblasten (n=2). Die Venensegmente erreichten nach der herzchirurgischen Operation anonymisiert das Labor und wurden gekühlt in M 199 Medium gelagert und zeitnah verarbeitet. Die geeigneten Stücke (>3,5 cm) wurden auf ihre Durchgängigkeit geprüft und beidseits mit einem Dreiwegehahn kanüliert.

Für die Isolierung der Fibroblasten wurde zuvor ein 1,5 cm langes Venensegment abgetrennt und separat in M 199 Medium bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

#### *Endothelzellen:*

In einem weiteren Schritt erfolgte das Durchspülen des Venensegments mit einem dafür hergestellten Medium (494 ml M199 + 5 ml Gentamycin (10mg/ml; Biochrom GmbH); + 5000 I.E. Heparin (Ratiopharm GmbH, Ulm, GER). Daraufhin wurde die Vene mit 10 ml einer steril filtrierten Kollagenase-Lösung (Kollagenase Typ 2, CLS-2 (253 u/mg) Worthington Biochemical Corporation/ CellSystems GmbH, St. Katharinen, GER) durchspült und bei geschlossenen Hähnen für t=15 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Um die Aktivität der Kollagenase zu stoppen, wurde die Vene im Anschluss mit 20 ml einer Lösung aus M199 und 20% FCS unter Pulsation durchspült und die Zellsuspension in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation für t=7 min bei 500 g. Das Zellpellet wurde danach in 4,5 ml ECGM aufgenommen, resuspendiert, in eine 12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflasche überführt und im Inkubator (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert.

#### *Fibroblasten:*

Das, vor der Isolierung der Endothelzellen, abgetrennte Venenfragment wurde durch einen Längsschnitt eröffnet und mit dem Skalpell in ca. 1 x 1 mm große Gewebestücke zerschnitten. Anschließend erfolgte die Platzierung dieser Stücke in einer Petrischale, zwischen den, zuvor aufgebrachten, Silikonpunkten. Mit der Pinzette wurde ein Deckglas auf die Silikonpunkte aufgelegt und fest gedrückt, sodass die Gewebestücke Kontakt zum Boden und dem Deckglas hatten. 10 ml FGM wurden dann seitlich und möglichst luftblasenfrei unter das Deckglas gebracht. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Petrischale (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>).

## 2.3 Zellkultur

Alle zwei Tage wurde das Zellwachstum evaluiert und dokumentiert und das jeweilige Medium gewechselt. Die Zellkultur erfolgte im Endothelzellmedium (ECGM; Promocell GmbH), versetzt mit 5% Fetalem Kalb Serum (FCS; Biochrom AG) und 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER). Das Fibroblastenmedium (FGM; Promocell GmbH) wurde ebenfalls mit 10% FCS und 1% penicillin-streptomycin versetzt.

### 2.3.1 Passagieren der Zellen

Bei vollständiger Konfluenz der Flaschen (90-100%) wurde die Zellschicht zuerst mit PBS gespült. Im Anschluss wurden die Zellen, mit einer für die jeweilige Größe der Zellkulturflaschen bewährten Menge Trypsin-EDTA Lösung (Sigma-Aldrich GmbH) in 1:20 Verdünnung, vom Boden abgelöst, um diese dann in eine größere Kulturflasche zu überführen. Nach optischer Absicherung der Zellablösung im Lichtmikroskop wurde die Trypsinreaktion mit einer Lösung aus 20% FCS und 80% M199 Medium gestoppt. Im Anschluss wurden die abgelösten Zellen in dieser Zellsuspension für  $t=5$  min bei 500 g zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in seinem jeweiligen Wachstumsmedium resuspendiert und in eine größere Kulturflaschen überführt.

### 2.3.2 Kryokonservierung der Zellen

Nach vollständiger Konfluenz der Zellkulturflaschen wurden diese wieder trypsiniert, zentrifugiert und in einer Suspension von 20% FCS und 70% Medium aufgenommen. Nach ausreichender Resuspension erfolge die Hinzugabe von 10% Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich GmbH). Nach gründlicher Durchmischung wurden 1,5 ml dieser Suspension auf die Kryoröhrchen (Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, GER) verteilt. Die Zellen wurden in einen Kryo-Gefrierbehälter (Nalge Nunc Cryo 1°C Freezing container, Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DNK) gegeben, um bei einer Geschwindigkeit von 1°C pro Minute bei einer Umgebungstemperatur von -80°C eingefroren zu werden.

### 2.3.3 Auftauen der Zellen

Vor dem Auftauen erfolgte die Herstellung des Auftaumediums mit 500 ml M199, 100 ml FCS und 1 ml Pen/Strep und das Erwärmen im Wasserbad auf 37°C. 12 ml davon wurden anschließend in Zentrifugenröhrchen aliquotiert. In einem weiteren Schritt wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C angetaut. Daraufhin fand der Transfer der Zellsuspension in einer sterilen Pipette mit etwas Medium in das Zentrifugenröhrchen statt. Da ein zu langes Verbleiben des DMSO in der Suspension die Zellen schädigt, war möglichst zügiges Arbeiten erforderlich. Im Anschluss wurde die Suspension für  $t=7$  min bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit zellspezifischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

## 2.4 Immunzytologie

### 2.4.1 Vorbereitung

Für die immunzytochemische Analyse wurden Zellen ( $1000 / \text{cm}^2$ ) auf 8-Well-Kammer-Objektträgern (Falcon, Corning Inc.) ausgesät und für  $t=1$  h inkubiert, damit die Zellen gleichmäßig auf den Objektträgern adhären konnten. Anschließend wurde 500  $\mu\text{l}$  Medium hinzugefügt und die Suspension über Nacht inkubiert ( $t=12$  h). Nach vollständiger Adhärenz wurde das Medium dekantiert, sodass kein Rückstand in den Kammern verblieb. Daraufhin erfolgte die sofortige Fixierung der Zellen mit  $-80^\circ\text{C}$  vorgekühltem 96%-igem Ethanol (Sigma-Aldrich GmbH) oder 4% Paraformaldehyd (PFA).

### 2.4.2 Färbung für die Immunzytologie unter dem Lichtmikroskop

Die Zellen konnten bis zur Färbung in 96%-igem Ethanol aufbewahrt werden. Vor Beginn des Färbeprozesses wurden die Objektträger aus dem Ethanol entnommen, die Lösung abgegossen und zweimalig für  $t=3$  min mit PBS gespült. Daraufhin wurde die endogene Peroxidaseaktivität mit 0,12%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Vector Laboratories INC, California, USA) in Wasser für  $t=10$  min blockiert. Es schloss sich eine erneute zweimalige Spülung mit PBS für  $t=3$  min an. Die Proben wurden für  $t=30$  min mit dem ersten Antikörper gefärbt, welcher zuvor mit PBS, 10% FCS und 4% BSA, entsprechend den Herstellerempfehlungen bzw. erprobten Verdünnungen des Labors, verdünnt wurde: der fibroblastenspezifische Antikörper TE-7 (c:

0,67 µg/ml; Verdünnung 1:150; Merck Millipore KGaA, Darmstadt, GER), der Antikörper gegen glatte Muskel-Myosin-Schwerketten (SMHC-Myosin; c: 23,9 µg/ml; Verdünnung: 1:40; Dako Deutschland), zum Nachweis der Endothelzellen Anti-CD31 (Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmolekül-1: PECAM-1; c: 10,3 µg/ml; Verdünnung: 1:20; Dako Deutschland) und anti-CD144 (VE-Cadherin; c: 5 µg/ml; Verdünnung 1:40; Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, GER). Es folgte erneut die zweimalige Spülung für t=3 min mit PBS. Unter Verwendung des Cytoscan HRP-Detektionssystem (Cell Marque / Sigma-Aldrich GmbH) erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem zweiten Antikörper. Dafür wurde CytoScan™ HRP aufgetropft und für t=10 min inkubiert. Danach wurde 2x für t=3 min mit PBS gespült. Für t=10 min wurde anschließend CytoScan™ HRP Streptavidin Label aufgetragen. Es erfolgte die erneute Spülung mit PBS.

Das AEC (3-amino-9-ethylcarbazole )-Peroxidase Substrat für den weiteren Schritt wurde wie folgt angesetzt: 5 ml a.d., 2 Tropfen Pufferlösung, 3 Tropfen Farbsubstrat und 2 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Jeweils ca. 300 µl dieses Substrats wurden dann auf die zuvor mit dem Cytoscan Detektionssystem behandelten Objektträger gegeben und für t=10 min inkubiert. Die Präparate wurden daraufhin für t=1 min in Leitungswasser gewaschen und die Kerne anschließend in Hämalun (Merck Millipore) mit einer Verdünnung von 1:4 in PBS für t=4 min gegengefärbt. Bevor die Objektträger mit wässrigem Deckmedium eingedeckt werden konnten, musste die Färbung erneut mit Leitungswasser gesäubert und für t=5 min gebläut werden. Entsprechende Negativkontrollen durch Weglassen der primären Antikörper erfolgten.

Im Anschluss erfolgte die Betrachtung der Färbungen unter dem Lichtmikroskop Axiovert 35 (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Jena, GER).

#### 2.4.3 Färbung für die Immunfluoreszenz

Für die Darstellung unter dem AxioObserver Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH) differierten die Vorbereitungsschritte für die Färbung: Die Zellen wurden vorerst in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert, in PBS gewaschen und für t=15 min permeabilisiert. Die Permeabilisierungslösung setzte sich aus PBS, ergänzt mit 10% FCS, 2% Rinderserumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich GmbH) und 0,1% Triton X-100 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER) zusammen.

Anschließend wurden die Objektträger mit PBS gewaschen und über Nacht mit den primären Antikörpern inkubiert unter Verdünnung mit PBS, ergänzt mit 10% FCS und 4% BSA. Anti-TE-7 (1:100; 1,0 µg/ml) und anti-von Willebrand-Faktor (1:100; 1,2 µg/ml; Sigma-Aldrich GmbH). Die sekundäre Antikörperreaktion an Tag 2 wurde mit den fluoreszierenden Antikörpern Anti-Maus-IgG Alexa-Fluor-555 (1:500; 2,4 µg/ml; Abcam plc, Cambridge, GRB) oder Anti-Kaninchen-IgG CF<sup>TM</sup>488A (1:500; 4 µg/ml; Sigma-Aldrich GmbH) für t=90 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Entsprechende Negativkontrollen durch Weglassen der primären Antikörper erfolgten.

#### *Darstellung des Zytoskeletts:*

Zusätzlich der Immunfluoreszenzfärbung der PFA fixierten Zellen erfolgte die Darstellung des Zytoskeletts mittels SiR-Actin (Spirochrome AG, Stein am Rhein, CH). Die SiR-Actin Lösung (c: 24,8 µg/ml; Verdünnung: 1:50) bedeckte die Zellen für t=60 min. Verapamil wurde für verbesserte Fluoreszenzsignale nach Herstellerempfehlungen hinzugefügt.

#### *DAPI – Kernfärbung:*

Zu der Immunfluoreszenzfärbung wurde die Zellkernfärbung durch Zugabe einer DAPI-Arbeitslösung (c: 1 µg/ml; Verdünnung: 1:1000; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D) realisiert. Das Prinzip der Färbung beruht auf der Interaktion von DAPI mit der DNA des Zellkerns. Die Proben wurden für t=20 min inkubiert, sodass die Zellen ausreichend mit der Arbeitslösung bedeckt waren.

#### *Mikroskopie am AxioObserver®:*

Die Proben wurden mit einem AxioObserver Fluoreszenzmikroskop visualisiert und mit der Software AxioVision (Rel. 4.8) analysiert. Die Mikroskopie der Proben erfolgte für den fluoreszierenden Antikörper CF<sup>TM</sup>488A bei einer Absorptionswellenlänge von  $\lambda_{\text{Abs}}=485$  nm und für Alexa-Fluor-555 bei einer Absorptionswellenlänge  $\lambda_{\text{Abs}}=540$  nm. Die Visualisierung des Actingerüsts erfolgte bei einer  $\lambda_{\text{Abs}}=652$  nm und die der Zellkerne mittels der DAPI Kernfärbung bei einer Absorptionswellenlänge von  $\lambda_{\text{Abs}}=340$  nm.

## 2.5 WST-1 Proliferationsassay

### 2.5.1 Hintergrund

Der WST-1 (water soluble tetrazolium) Assay dient zum Vergleich bzw. Nachweis der Wachstumsraten der gewonnenen Zellen. So wird bei intakter Atmungskette ein Farbumschlag des rotgefärbten Tetrazoliumsalz WST-1 in das gelb gefärbte Formazan beobachtet (Abb. 11A-C). Diese Umsetzung lässt sich dann durch Messung der optischen Dichte im Photometer analysieren und auswerten. Die optische Dichte ist eine Maßeinheit für die „*Transmission von Licht durch ein Medium*“ [136]. Sie ist definiert als „der dekadische Logarithmus des im Medium mit dem Absorptionskoeffizienten  $\alpha(\lambda)$  auf der Strecke  $l$  absorbierten Lichts der Wellenlänge  $\lambda$ :  $D(\lambda) = \log(1 - e^{-\alpha l})$ “ [136]. Durch die Messung der optischen Dichte kann somit die Stoffwechselaktivität der Zellen quantitativ ermittelt werden.

### 2.5.2 Vorbereitung

Zur Vorbereitung wurden auf einer 12-Well Platte pro Well 50.000 Zellen ausgesät. Die Aussaat der Zellen erfolgte in 500  $\mu$ l Medium pro Ansatz. Dabei musste die Zelldichte hoch genug sein, um einerseits Zell-Zell Kontakte auszubilden, andererseits gering genug, um die Proliferation über 4 Tage zu ermöglichen. Aufgrund der verschiedenen Abnahmezeitpunkte (Tag 1  $t=24$  h, Tag 2  $t=48$  h, Tag 3  $t=72$  h) waren jeweils drei Besiedlungsansätze pro Zellreihe erforderlich. Die Aussaat der Zellreihen erfolgte als Doppelwert, sodass insgesamt sechs Besiedlungsansätze von jeder Zellreihe ausgesät wurden. Als Kontrolle fungierten die herkömmlichen Fibroblasten und Endothelzellen, die aus der Vena saphena magna isoliert wurden.

### 2.5.3 Photometrie

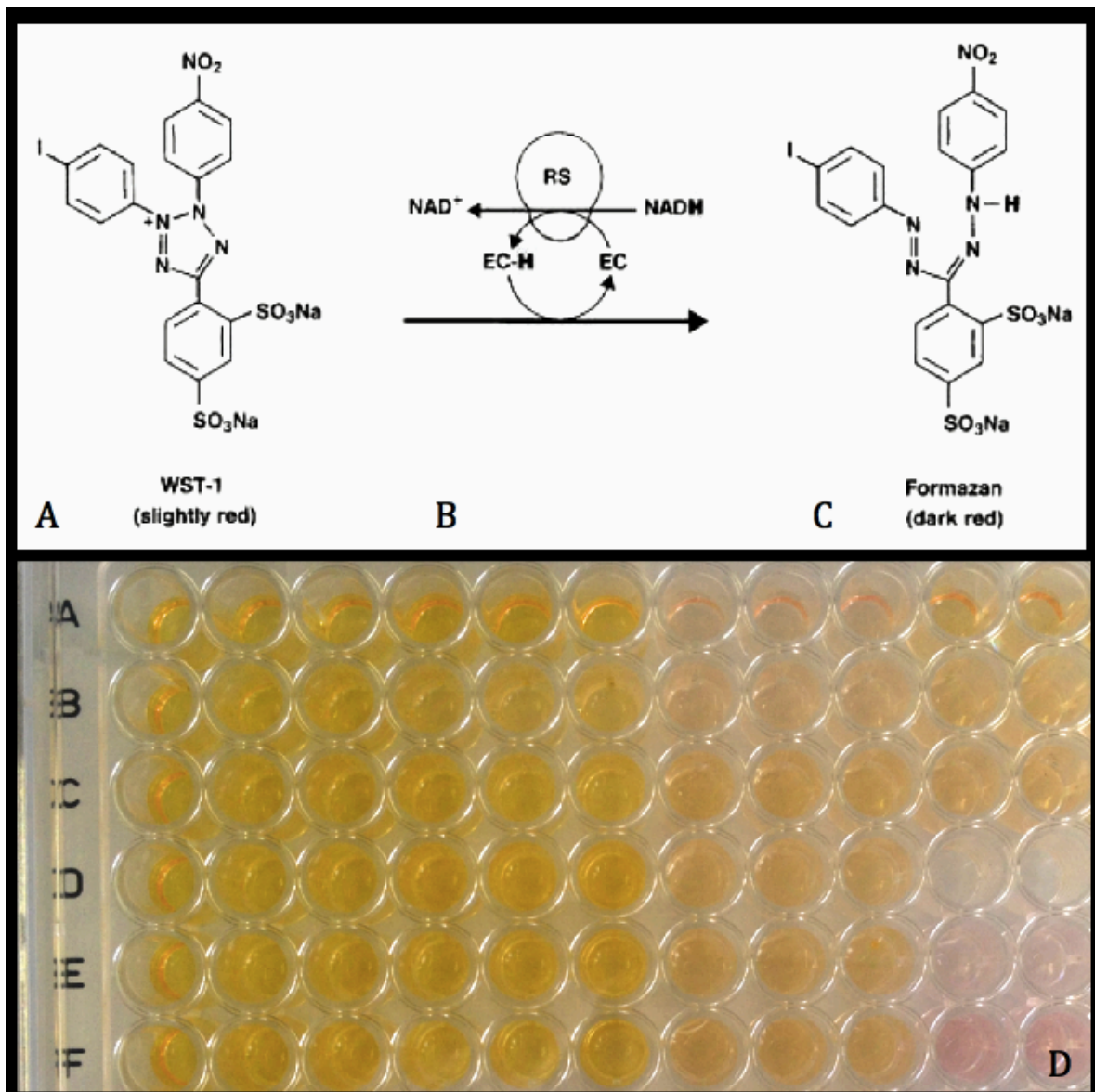
Zur Bestimmung der Proliferation wurde der Assay an aufeinanderfolgenden drei Tagen im Abstand von  $t=24$  h zur Messung der mitochondrialen Aktivität durchgeführt.

Am jeweiligen Messtag wurden pro Ansatz 50  $\mu$ l WST-1 Stocklösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, GER) mit 450  $\mu$ l des jeweiligen Kulturmediums in einem Eppendorf Gefäß verdünnt. Das sich auf den Zellen befindliche Kulturmedium wurde vollständig abgenommen



und im darauffolgenden Schritt wurden die 500 µl Arbeitslösung auf den Besiedlungsansatz gegeben. Die Wellplatte wurde daraufhin für  $t=30$  min bei  $37^{\circ}\text{C}/5\%$   $\text{CO}_2$  inkubiert. Der Farbumschlag von WST-1 (hellrot) zu Formazan (gelb) war bei den Wells mit vorhandenen vitalen Zellen zu beobachten.

Für die photometrische Messung wurden pro Besiedlungsansatz  $3 \times 100$  µl umgesetzte WST-1 Lösung in 3 Wells einer 96-Well-Platte überführt (Abb. 11D). Die Messung der optischen Dichte erfolgte im Mikrotiterplatten-Photometer Multiskan EX. Die Angaben der optischen Dichte  $E$  erfolgte als logarithmische Größe und berechnete sich aus dem Kehrwert des Transmissionsgrades  $\tau$ . Um die notwendigen Leerwerte zu erhalten, wurde die WST-1 Stocklösung zu dem jeweiligen Medium in einem nicht mit Zellen besiedelten Well gegeben. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Computersoftware „Ascent Software for Multiscan“. Um die endgültigen Ergebnisse vergleichen zu können, wurde der ermittelte Leerwert jeweils von den Messwerten subtrahiert.

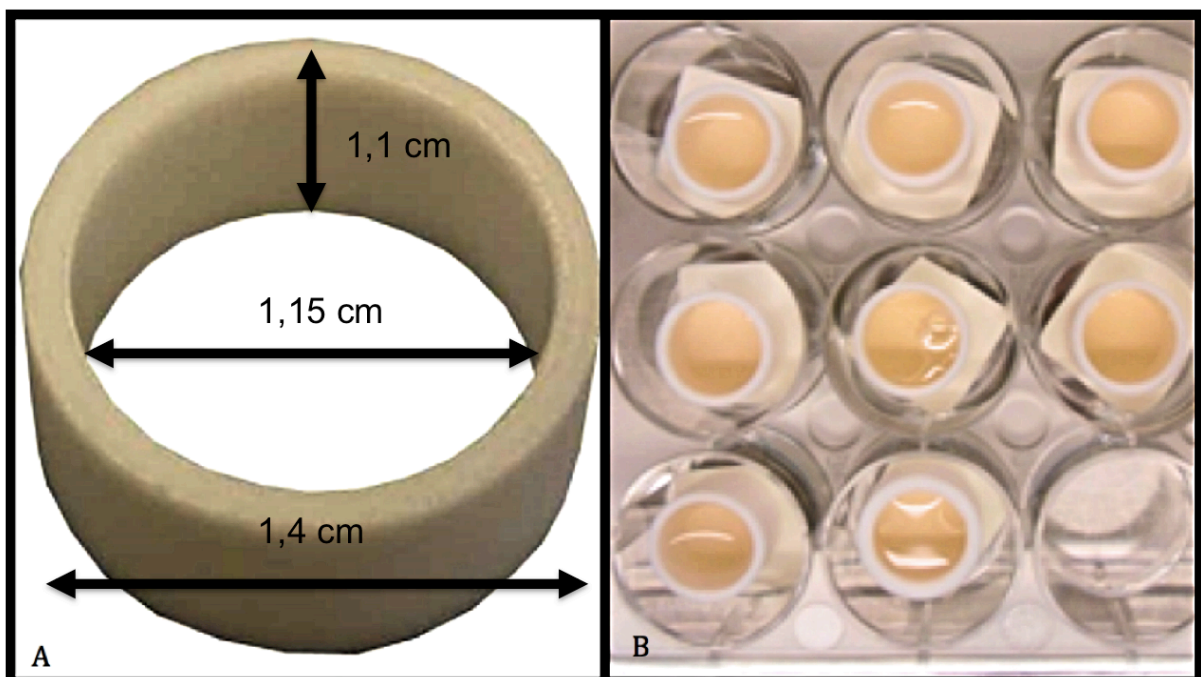


**Abbildung 11: Chemische Reaktion bei dem WST-1 Proliferationsassay:** (A) Umsetzung des rotgefärbten Tetrazoliums Salzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) in das gelbgefärbte Formazan (C), welches nur durch vitale Zellen mit einem intakten mitochondrialen SuccinatTetrazolium Reduktase System (RS) umgesetzt werden kann (B); (D) Pro Besiedlungsansatz wurde 3x 100 µl umgesetzte WST-1 Lösung in eine 96-Well-Platte überführt. Die Messung der optischen Dichte, hier als Farbumschlag bereits deutlich zu sehen, erfolgte im Mikrotiterplatten-Photometer Multiskan EX.

Bildquelle (A-C): [www.lifescience.roche.com](http://www.lifescience.roche.com)

## 2.6 Zellbesiedelung auf Polyurethan-Patches

Die Polyurethan-Patches (ITV Denkendorf, Denkendorf, GER) wurden auf einer Größe von 1,5 x 1,5 cm zugeschnitten und in eine 12-Well Platte platziert. Die Aussaat der Zellen erfolgte mit einem Richtwert von 750.000 Zellen/cm<sup>2</sup> und unter der Verwendung eines Teflon-Besiedelungsringes konnte die Zellaussaat auf der gewünschten Stelle des PU Patches garantiert werden (Abb. 12A). Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Mediums, dessen Farbe täglich kontrolliert werden und aufgrund der hohen Zellmenge bei Bedarf gewechselt werden musste. Nach der statischen Besiedlung von sieben Tagen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde in einem weiteren Schritt unter identischen Bedingungen die patientenspezifischen Endothelzellen auf die FB-beschichteten Patches ausgesät. Diese wurden dann mittels Vital-Letal Färbung, Rasterelektronenmikroskopie und Immunhistochemie ausgewertet.



**Abbildung 12: Zellbesiedelung auf Polyurethanpatches mit Hilfe von Teflon Besiedelungsringen: (A) Teflonring mit Gesamtinnenfläche von 1 cm<sup>2</sup> (Durchmesser innen = 1,15 cm, Durchmesser außen = 1,4 cm, Höhe = 1,1 cm); (B) Zellaussaat auf Polyurethanpatches mit entsprechenden Teflon Besiedelungsringen in einer 12-Well Platte. Bildquelle (A): <https://dir.indiamart.com/impcat/teflon-ring.html>**

## **2.7 Immunhistochemie mittels Immunfluoreszenz**

### 2.7.1 Anfertigung von Kryoschnitten

Zur Anfertigung der Kryoschnitte wurde das besiedelte Patchstück auf eine Größe von ein 0,5 x 0,5 cm zugeschnitten, in eine 4% PFA-Lösung überführt und für  $t=10$  min bei Raumtemperatur fixiert. Es folgte ein gründlicher Waschvorgang mit PBS. Die Patches wurden daraufhin in einem Gefriereinbettmedium (Shandon™ Cryomatrix™; Thermo Fisher Scientific) eingebettet. Kryoschnitte mit einer Dicke von  $10\text{ }\mu\text{m}$  wurden unter Verwendung eines Gefriermikrotoms (Cryostat Microm HM560; Thermo Fisher Scientific) geschnitten und auf Objektträgern (Superfrost®; Gerhard Menzel, Braunschweig, GER) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Färbung gelagert.

### 2.7.2 Immunhistochemische Färbung

Die Kryoschnitte wurden aufgetaut, in PBS gewaschen und für  $t=15$  min mit einer Permeabilisierungslösung inkubiert. Diese Lösung setzte sich zusammen aus PBS mit 10% FCS, 2% BSA und 0,1% Triton X-100. Die Antigendemaskierung erfolgte unter Verwendung von Proteinase (25  $\mu\text{g/ml}$ ; Sigma-Aldrich GmbH) für  $t=6$  min. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit primären Antikörpern für  $t=12$  h inkubiert. Alle Antikörper wurden nach Herstellerempfehlung durch PBS ergänzt mit 10% FCS und 4% BSA verdünnt: für die Fibroblasten der spezifische Antikörper gegen TE-7 (c: 1,0  $\mu\text{g/ml}$ ; Verdünnung : 1:100) und für die Endothelzellen der spezifische Antikörper gegen vWF (c: 1,2  $\mu\text{g/ml}$ ; Verdünnung: 1:100). Die EZM Färbung wurde durch Inkubation mit den folgenden Antikörpern durchgeführt: Anti-Collagen IV (c: 9  $\mu\text{g/ml}$ ; Verdünnung: 1:600; Sigma-Aldrich GmbH), Anti-Laminin (c: 64  $\mu\text{g/ml}$ ; Verdünnung: 1:500; Sigma-Aldrich GmbH), Anti-Fibronectin (c: 0,2  $\mu\text{g/ml}$ ; Verdünnung: 1:3000; Sigma-Aldrich GmbH), Anti-Elastin (c: 10  $\mu\text{g/ml}$ ; Verdünnung: 1:100; Sigma-Aldrich GmbH).

Am Folgetag erfolgte die erneute Spülung mit PBS und die Färbung mit den sekundären Antikörpern: Bei den Proben mit Anti-TE-7, Anti-Elastin, Anti-Fibronectin und Anti-Collagen IV erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers Anti-mouse IgG AF 555 (c: 2,4  $\mu\text{g/ml}$ ; Verdünnung: 1:500). Bei den Proben mit Anti-Laminin und anti-vWF erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers Goat anti-rabbit IgG AF 647 (c: 4  $\mu\text{g/ml}$ ; Verdünnung 1:500). Die Proben wurden für  $t=90$  min bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer inkubiert. Die

benötigten Sekundärantikörperverdünnungen wurden lichtgeschützt angesetzt und ebenfalls im Dunkeln auf die Objektträger gegeben.

Zusätzlich zu der immunhistologischen Färbung wurde im Anschluss die Zellkernfärbung durch Zugabe der DAPI Arbeitslösung durchgeführt (s.o.). Die Mikroskopie unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte bei entsprechenden Absorptionslängen (s.o.).

## **2.8 Vital-Letal Färbung**

Die Reagenzien Syto9® (Life Technologies GmbH, Darmstadt, GER) und Propidiumiodid (PI; Sigma-Aldrich GmbH) geben bei gemeinsamer Zugabe zu suspendierten oder adhärenen Zellen Aufschluss über deren Vitalität. Syto9 penetriert durch die Zellmembran vitaler Zellen und färbt sowohl DNA als auch RNA. Letale Zellen mit geschädigter Zellmembran werden durch die Interaktion von PI mit DNA/RNA gefärbt. Es sollte angemerkt werden, dass vitale Zellen adhären und letale Zellen frei im Kulturmedium flotieren, sodass das Medium nicht verworfen werden darf und Teil der Auswertung sein sollte. Der Life/Dead® Vitalitätsassay wurde an PU-Proben direkt nach der Kultivierung durchgeführt. Die besiedelten Patches wurden mit 0,5 µl Syto9® (Life Technologies GmbH, Darmstadt, GER) und 1 µl PI in 450 µl des entsprechenden Mediums (cPI: 25mM & cSyto: 5mM) mikroskopiert. Es war keine Inkubationszeit nötig und die Zellen wurden umgehend gefärbt. Die Visualisierung und Dokumentation erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop AxioObserver. Tote Zellen konnten bei einer Wellenlänge von 485 nm durch den hinzugegeben Farbstoff visualisiert werden, während lebende Zellen bei einer Wellenlänge von 540 nm fluoresziert wurden.

## 2.9 Rasterelektronenmikroskopie

Für die Analyse unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) ist es wichtig, dass die Proben zu Beginn fixiert, entwässert und am Ende leitend gemacht werden. Die Kritisch-Punkt-Trocknung ist ein essentieller Schritt bei der Vorbereitung der Proben, da die Analyse im Mikroskop unter Hochvakuum stattfindet. Hierbei besteht die Gefahr, dass bei nassen Proben Flüssigkeiten verdampfen und so eventuell zur Zerstörung des Materials führen. Daher wird das in den Proben vorhandene Wasser über Ethanol als Zwischenschritt durch flüssiges CO<sub>2</sub> ersetzt, welches sich am besten für diese Trocknung eignet. Der kritische Punkt des verwendeten CO<sub>2</sub> liegt bei 31°C und 73,8 bar. Durch die Entwässerung der Proben geht deren Leitfähigkeit verloren, weswegen die Probe zusätzlich mit einer dünnen Goldschicht versehen werden musste [137].

### 2.9.1 Fixierung

Die besiedelten Polyurethan Patches wurden in FIX II, einer Fixierlösung aus 456 ml Ampuwa, (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Germany), 0,75 ml Salzsäure (Merck Millipore), 43,5 ml Glutaraldehyd-Lösung (Sigma Aldrich), und 5,65g Natrium Cocodylat Trihydrat (Sigma-Aldrich) für mindestens t=48 h bei 4°C gelagert.

### 2.9.2 Aufsteigende Alkoholreihe

Durch die Alkoholreihe konnte die Fixierlösung durch reinen Ethanol (99,9%; Sigma Aldrich) ersetzt werden. In Schritten von t=10 min wurde die Fixierlösung mithilfe steigender Alkoholkonzentrationen (30%, 50%, 70%, 96%) ausgespült, sodass die Proben schließlich in vorgekühltes (-20°C) Ethanol (99,9%) überführt werden konnten. Im Anschluss wurde die Kritisch-Punkt-Trocknung durchgeführt.

### 2.9.3 Kritisch-Punkt-Trocknung

Die Proben wurde mit reinem Ethanol (99,9%) in die Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners (CPD 030 Critical Point Dryer, BalTec Schalksmühle, GER) gegeben und verschlossen. Nach dem Abkühlen der Druckkammer auf 8°C wurde, das reine Ethanol durch CO<sub>2</sub> ersetzt. Dieser Spülvorgang wurde zehnmal durchgeführt. Daraufhin wurde die Kammer

über den kritischen Punkt des CO<sub>2</sub> (31°C) hinaus auf 42°C erhitzt. Durch die höher gewählte Temperatur konnten Kondensationsrückstände auf den Proben während des Gas-Ablasses und dem damit einhergehenden Druckabfall verhindert werden. Innerhalb von t=30 min wurde das Gas im Anschluss langsam abgelassen.

#### 2.9.4 Goldbeschichtung am Sputter Coater

Die getrockneten Proben wurden nun mit einem doppelseitigem Klebeband auf einem Metallhalter befestigt. Dieser wurde in die Sputterkammer des Sputter Coaters SCD50 (BalTec, Schalksmühle, GER) gesetzt. Da ein möglichst reines Vakuum für die Goldbeschichtung benötigt wurde, erfolgte das Einbringen von Argon im Austausch mit Luft in die Kammer. Der Sputtervorgang wurde im Anschluss bei einer Spannung von 570 Volt (28mA) für t=180 sek begonnen.

#### 2.9.5 Rasterelektronenmikroskopische Analyse

Zur weiteren Evaluation wurden die vorbereiteten Proben in der Kammer des Rasterelektronenmikroskops (Zeiss Evo LS, Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER) befestigt.

Zur Mikroskopie wurde in der Kammer ein Hochvakuum aufgebaut. Mittels elektromagnetsicher Spulen fokussiert sich der Elektronenstrahl auf einen bestimmten Punkt der Probe. Trifft dieser auf das Objekt, sind verschiedene elastische und inelastische Wechselwirkungen möglich. Der von der Kathode kommende Elektronenstrahl wird daraufhin über die Oberfläche des Objekts geführt, was als Rastern bezeichnet wird. Das empfangene Signal wird mit Hilfe eines BSE Detektors (backscattered electron) in Grauwertinformation umgewandelt [138]. Die spätere Bildausgabe und digitale Datenspeicherung erfolgte am Computer.

## **2.10 Erfassung der Patientendaten**

Nach der herzchirurgischen Operation wurden die benötigten Daten für die Errechnung des EuroSCOREs II erfasst. Nach Errechnung des EuroSCOREs wurde auf die Dokumentation der dafür benötigten Parameter verzichtet. Das Alter der Patienten, welches im EuroSCORE II mit beinhaltet ist, wurde zusätzlich dokumentiert. Das Europäische System für die kardiovaskuläre Risikobewertung (EuroSCORE) ist ein Risikomodell zur Vorhersage der Mortalität bei herzchirurgischen Eingriffen. Es wurde 1999 veröffentlicht und basiert auf Patientendaten der internationalen europäischen Datenbank, die bei herzchirurgischen Eingriffen bis Ende 1995 erhoben wurden. Der EuroSCORE II ist eine verbesserte Berechnung des ursprünglichen Risikomodells. [57, 139]

Die erhobenen Parameter wurden irreversibel anonymisiert und tabellarisch dargestellt.

Zusätzlich erfolgte die Erfassung der kardiopulmonalen Bypasszeit, die Zeit während der extrakorporalen Zirkulation unter der Angabe in t=min.

## **2.11 Statistische Auswertung**

Die Messungen der optischen Dichte des WST-1 Proliferationsassay wurden tabellarisch dargestellt. Zusätzlich erfolgte die Angabe der prozentualen Veränderung zwischen t=24 und t=72h und wird als Maß für das Zellwachstum bzw. das Wachstumsverhalten der Zellen herangezogen. Für den Vergleich der Messwerte zwischen der Untersuchungsgruppe mit denen der Kontrollgruppe, erfolgte ein zweiseitiger T-Test für unabhängige Stichproben. Die Ergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich gewertet bei  $p < 0,05$ .

Um mögliche Effekte der erhobenen Parameter (Lebensalter, EuroScore II und Bypasszeit) auf die Wachstumsraten der Zellreihen zu untersuchen, erfolgte eine Korrelationsanalyse unter der Verwendung des Korrelationskoeffizienten  $r$  nach Bravais Pearson. Ferner erfolgte die Ermittlung der Signifikanz auf Basis der zweiseitigen t-Verteilung. Im Anschluss wurde die Korrelation mittels Streudiagramm dargestellt. Hierbei wird sich auf das Wachstumsverhalten zwischen t=24h und t=72h bezogen.

Die gesamte statistische Auswertung erfolgte mit dem Microsoft Office Programm Excel.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zellmorphologie der Primärkultur

Nach  $4 \pm 2$  Tagen in Inkubation waren bereits adhärenente Zellen am Boden der Kulturflasche sichtbar (Abb. 13). Anfängliches Wachstum adhärenenter Zellen wurde in allen Zellreihen aus allen drei Isolationsmethoden erreicht. Die Erlangung einer Zellkultur aus endothelzellähnlichen Zellen war nur aus den Blutbestandteilen möglich. Die fibroblastenähnlichen Zellen wurden ausschließlich aus den feinporigen Filternetzen gewonnen. Die Kultivierung und Vermehrung von Zellen aus großporigen Filternetzen war in allen Zelllinien vergeblich. Hier konnte allerdings in der Primärkultur unspezifisches Wachstum von Zellen verschiedenster Morphologie beobachtet werden.

Nach  $5 \pm 2$  Wochen erlangten die Fibroblasten ( $n=7$ ) und Endothelzellen ( $n=4$ ) vollständige Konfluenz. Bereits eine Zellzahl von  $3 \pm 0,5 \times 10^6$  Zellen reichte für die jeweilige Analyse bzw. Kryokonservierung der Zellen aus. Frustrane Kultivierungsversuche zeigten sich im Wachstumsmedium für Fibroblasten in  $n=3$  (Filter 5,6,9) und im Wachstumsmedium für Endothelzellen in  $n=6$  (Vollblut der Patienten 1,4,5,7,8 und 9).

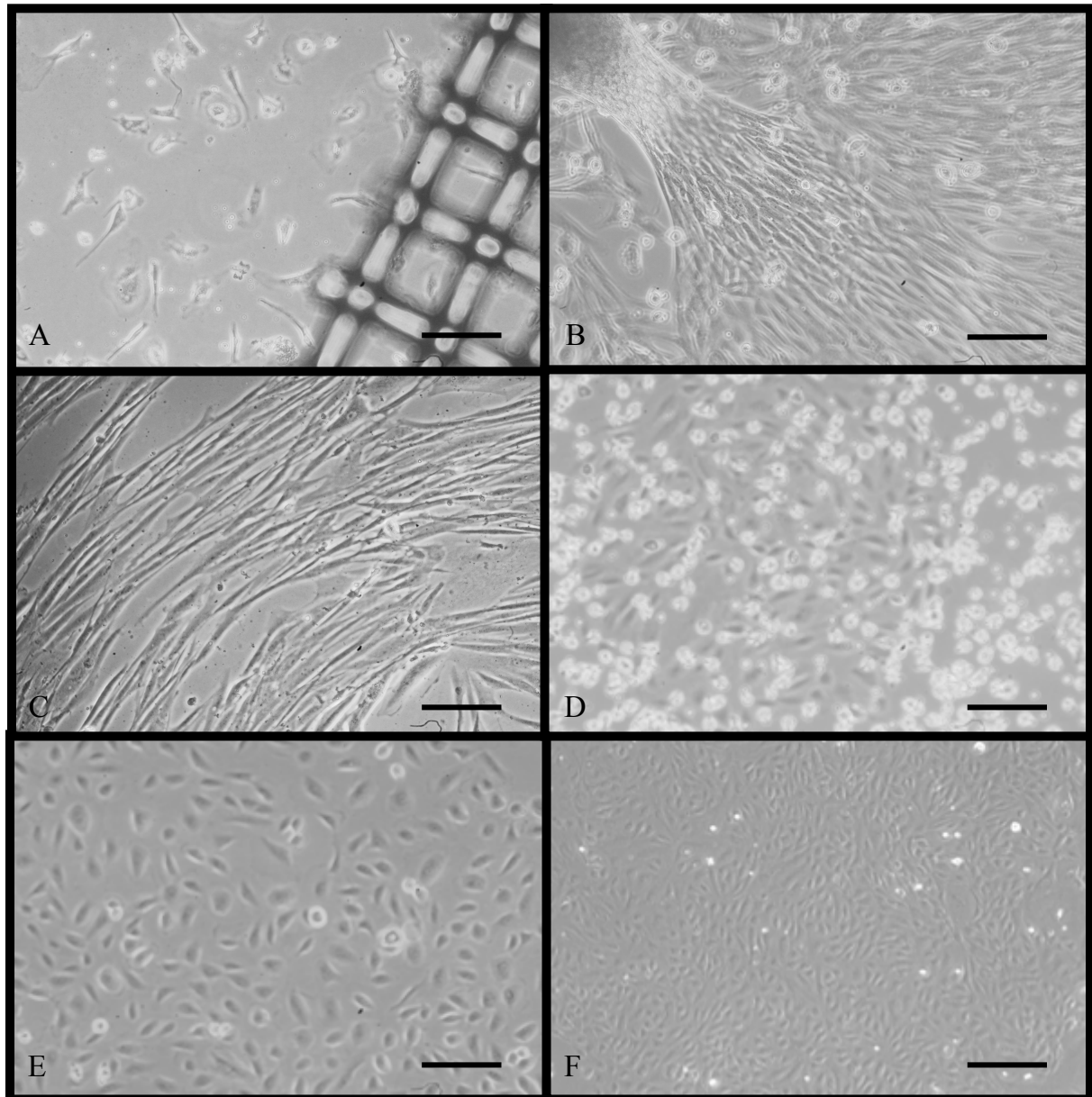
#### 3.1.1 Wachstum von spindelförmigen Zellen

Bei den feinporigen Filtern wurde bereits nach einigen Tagen ein Wachstum von spindelförmigen Zellen unter den Netzen detektiert (Abb. 13A). In einigen Fällen kam es direkt aus den Fasern der Filternetze zu einem Wachstum (Abb. 13B). In allen Zellreihen der feinporigen Filternetze kam es zu einem anfänglichen Wachstum von spindelförmigen Zellen. In  $n=7$  Zellreihen konnten diese Zellen bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert werden. Die Morphologie der langgestreckten Zellkörper mit den Fortsätzen, sowie deren Wachstumsverhalten glich den Fibroblasten der Kontrollgruppe. Die Gewinnung von fibroblastenähnlichen Zellen aus dem Vollblut blieb erfolglos.

Da die gewonnen Zellen im Nachhinein als Fibroblasten identifiziert wurden, wird nachfolgend von Fibroblasten gesprochen.

### 3.1.2 Wachstum von pflastersteinartigen Zellen

Bei den isolierten Zellen aus dem Vollblut kam es in n=4 Zellreihen zum Wachstum von pflastersteinartigen Zellen nach  $t=7\pm 2$  Tagen (Abb. 13D). Die Formation von Zellkolonien geschah nach  $t=10\pm 2$  Tagen (Abb. 13E). Nach  $t=4\pm 1$  Wochen zeigten die Zellen ein Pflastersteinrelief mit einem runden und kompakten Erscheinungsbild (Abb. 13F). Da die gewonnenen Zellen im Nachhinein als Endothelzellen identifiziert wurden, wird nachfolgend von Endothelzellen gesprochen.

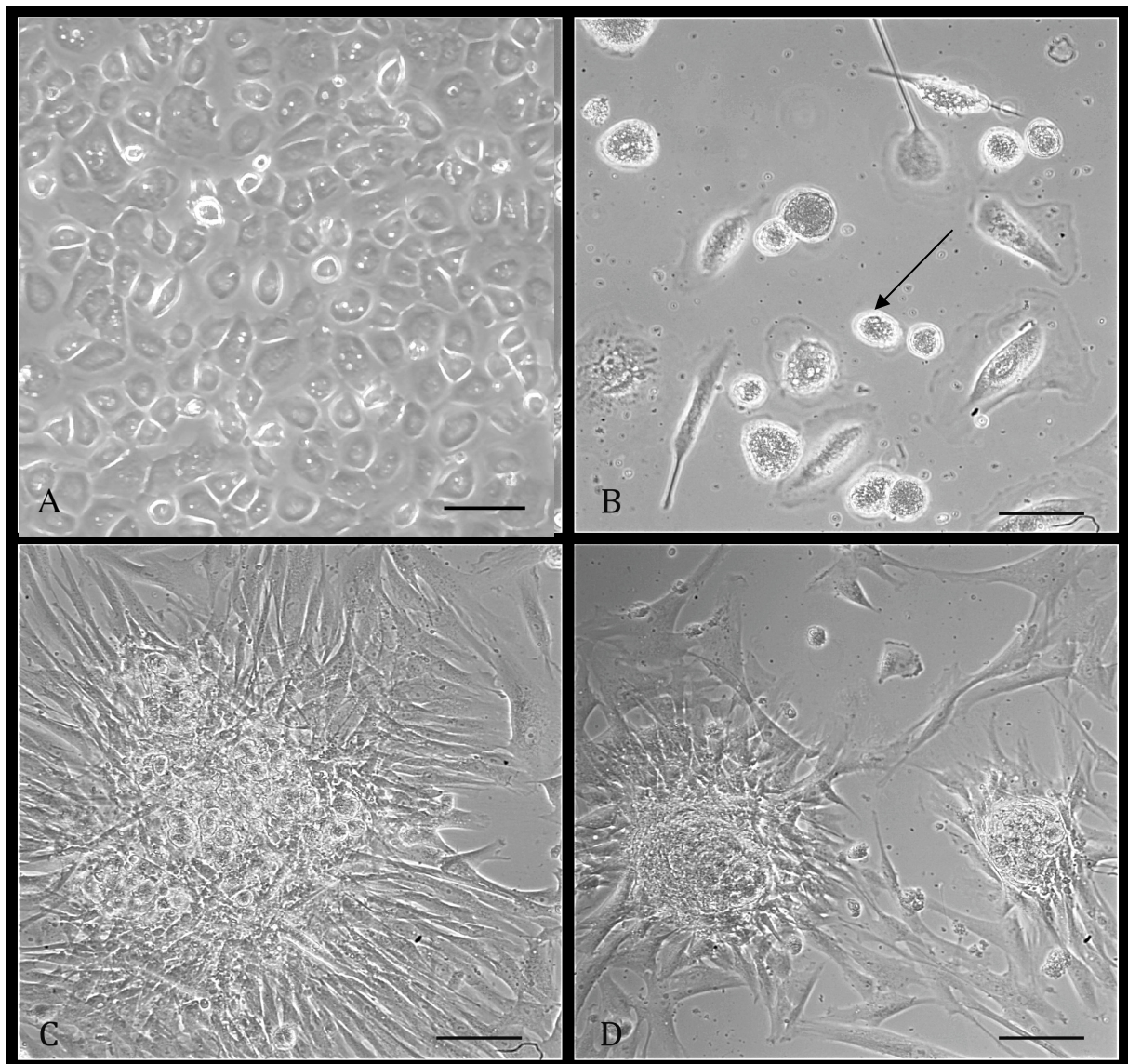


**Abbildung 13: Mikroskopische Auswertung der Zellkultur von Fibroblasten (FB) und Endothelzellen (EC):**  
 (A) Beginn des Wachstums von FB in der Petrischale mit einem feinporigen Filternetz nach einer Woche;  
 (B) Direktes FB Wachstum aus dem Filternetz sichtbar; (C) FB Kultur nach 5 Wochen; (D) Formation von EC  
 Kolonien auf dem Boden der Zellkulturflasche nach 10 Tagen (die heller erscheinenden Zellen sind  
 womöglich abgestorbene, nicht adhäre Zellen); (E) Endothelzellkolonie nach drei Wochen; (F) Typisches  
 Pflastersteinrelief der Endothelzellen nach fünf Wochen; Maßstab (A-E): 150 µm ; (F) : 300 µm

### 3.1.3 Wachstum von Zellen anderer Morphologie aus großporigen Filternetzen

In der Primärkultur der großporigen Filternetze kam es zum Wachstum von epithelartigen Zellen (Abb. 14 A). Ferner wurde ein Wachstum von kleinen, runden Zellen mit einem Durchmesser von ca. 10-15  $\mu\text{m}$  beobachtet (Abb. 14 B). In n=2 Zellreihen fiel die Formation von Zellkonglomeraten mit einem radiären Wachstumsverhalten auf (Abb. 14 C-D).

Eine genaue Identifizierung dieser Zellen konnte bei frustranen Kultivierungsversuchen nicht durchgeführt werden.



**Abbildung 14: A-D: Zellformation und Wachstumsverlauf beobachteter Zellen aus Primärkultur von großporigen Filternetzen: (A) Wachstum von epithelartigen Zellen; (B) helle und runde Zellen mit einer Größe von 10 bis 15  $\mu\text{m}$  ( $\rightarrow$  Pfeil); (C-D) Bildung von Zellkonglomeraten mit radiär angeordneten Zellen im weiteren Verlauf; Maßstab (A+B): 25  $\mu\text{m}$ , (C-D): 150  $\mu\text{m}$**

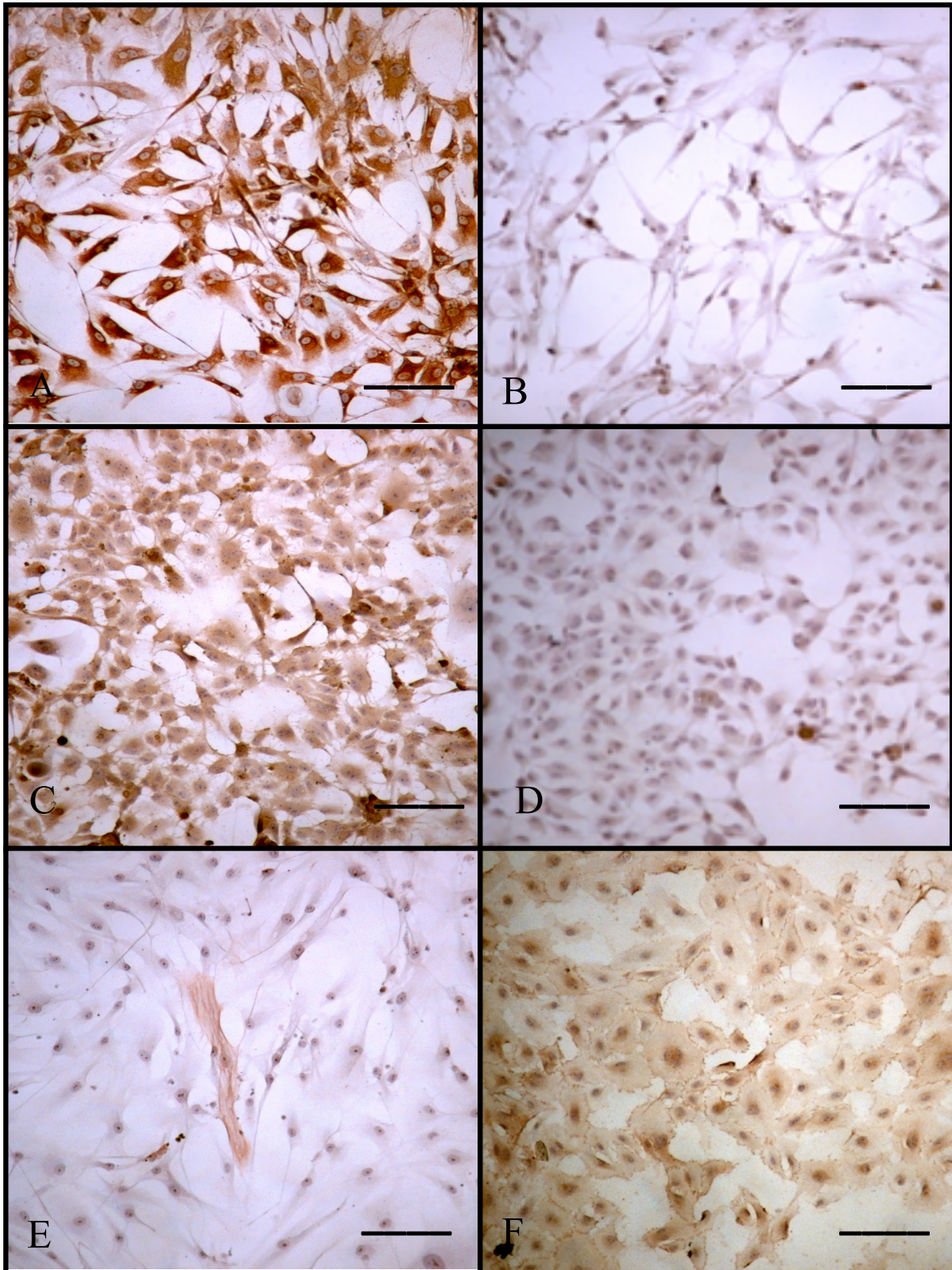
### 3.2 Immunzytologie

Die langgestreckten Zellkörper färbten sich positiv gegen den FB-spezifischen Antikörper TE-7. Dies konnte sowohl unter dem Lichtmikroskop (Abb. 15A) als auch unter dem Immunfluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden (Abb. 16A). Die endothelzellähnlichen Zellen färbten sich positiv gegen die endothelzell-typischen Antikörper CD31 (PECAM-1 - Abb. 15C) und CD144 (VE-Cadherin - Abb. 15F) und wurden unter dem Lichtmikroskop nachgewiesen. Für den Nachweis der Endothelzellen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop erfolgte die Färbung gegen vWF (Abb. 16B).

Die Anfärbung einer FB typischen Zellkultur fiel negativ gegen den EC spezifischen Antikörper CD 31 aus (Abb. 15B). Die Anfärbung einer EC typischen Zellkultur zeigte eine negative Färbung gegen den FB-spezifischen Antikörper TE-7 (Abb. 15D). Somit wurde dies als Abwesenheit von Fibroblasten in der Endothelzellkultur und Abwesenheit von Endothelzellen in der Fibroblastenkultur gewertet. Zusätzlich erfolgte in allen isolierten Zellreihen eine Färbung auf SMC-Myosin, welches unter dem Lichtmikroskop visualisiert wurde. Einige Proben (n=3) zeigten eine positive Färbung gegen SMC-Myosin und gaben so einen Hinweis für die Anwesenheit von glatten Muskelzellen in den Primärkulturen (Abb. 15B).

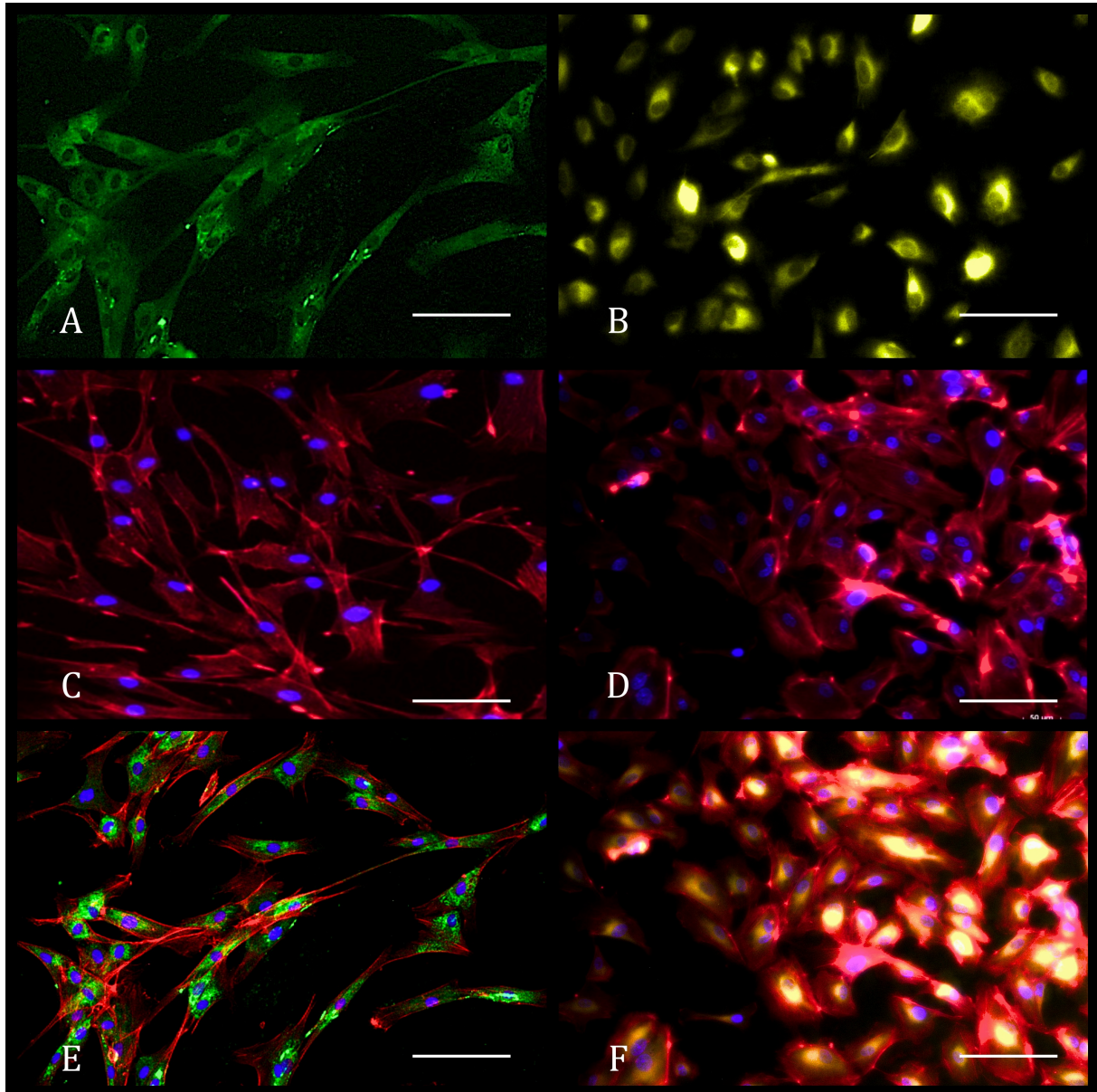
Ferner wurde die Zellmorphologie mittels SiR Actin genauer illustriert. Dabei imponierten bei den Fibroblasten (positiv auf TE-7) die vielen unregelmäßigen zytoplasmatischen Zellfortsätze (Abb. 16C+E) und bei den Endothelzellen (positiv auf vWF) ein typisches Kopfsteinpflastermuster (Abb. 16F). Zusätzlich erfolgte die DAPI Kernfärbung, in der sich jeweils der zentrale Zellkern darstellen ließ.





**Abbildung 15: Immunzytologische der Primärkultur: (A) positive Färbung gegen TE-7 bei FB typischen Zellen; (B) negative Färbung gegen CD31 bei FB typischen Zellen; (C) positive Färbung gegen CD 31 bei EC typischen Zellen; (D) negative Färbung gegen TE-7 bei EC typischen Zellen; (E) positive Färbung gegen SMC-Myosin; (F) positive Färbung gegen CD 144 bei EC typischen Zellen; A-F 100µm**





**Abbildung 16: Immunzytologie mit Fluoreszenzfarbstoff:** (A) Durch Färbung mit Antikörpern gegen TE-7 (grün) konnte ebenfalls das Vorhandensein von Fibroblasten (A+E) verifiziert werden. (C+E) Das Zellskelett der Fibroblasten mit den langgezogenen Zellfortsätzen stellt sich durch Färbung mit SiR Actin rot dar; Durch Färbung mit dem Antikörper gegen vWF (gelb) konnte das Vorhandensein von Endothelzellen (B+F) verifiziert werden; (D+F) Zusammen mit SiR Actin wird das typische Kopfsteinpflastermuster eines Endothelzellverbands dargestellt; (C-F) Zellkerne stellen sich durch eine positive DAPI Färbung blau dar; Maßstab (A-F): 100µm

### 3.3 WST-1 Proliferationsassay der isolierten Zellen

#### 3.3.1 Wachstumsverhalten der Fibroblasten

Der durchgeführte Proliferations-Test mit dem WST-1 Reagens zeigte in allen Zelllinien einen Farbumschlag und spricht somit für eine vorhandene Zellvitalität. Während der Versuchsreihe zeigte eine Zunahme der gemessenen optischen Dichte, was für eine Zunahme der Zellaktivität spricht und somit die Differenz der Messwerte als Wachstum angesehen werden kann. Die Mittelwerte der Versuchsgruppe zu jedem Zeitpunkt ( $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ) scheinen insgesamt höher als die der Kontrollgruppe (Tab. 3A). Der Unterschied der Messungen beider Gruppen sind mit  $p < 0,05$  statistisch signifikant (Tab. 1 im Anhang).

Zusätzlich fiel bei der graphischen Auswertung der Messwerte auf, dass es innerhalb der Versuchsreihen zu einer Unterteilung bzw. Gruppierung der Ergebnisse kommt (Abb. 17). Gruppe 1 (Filter 2, 3, 7, 10) zeigte Werte von höherer optischer Dichte (Mittelwerte:  $t_1=0,561 \pm 0,114$ ;  $t_2=0,694 \pm 0,103$ ;  $t_3=0,899 \pm 0,209$ ), Gruppe 2 (Filter 1, 4, 8) wies dagegen Werte niedrigerer Dichte (Mittelwerte:  $t_1=0,250 \pm 0,111$ ;  $t_2=0,257 \pm 0,148$ ;  $t_3=0,232 \pm 0,066$ ) auf. Ausgehend von der optischen Dichte bei  $t_1$  erfolgte eine Extinktionssteigerung, also ein positives Wachstumsverhalten der Fibroblasten in Gruppe 1 bei  $t_2$  um 24% und bei  $t_3$  um 60%. In Gruppe 2 wurde bei  $t_2$  eine Extinktionssteigerung von 3% und bei  $t_3$  ein Extinktionsverlust von 7% gemessen. In der Kontrollgruppe wurde bei  $t_2$  ein Extinktionsverlust von 29% und bei  $t_3$  eine Extinktionssteigerung von 10% gemessen (Tab. 3B). Die Werte der Kontrollgruppe ähnelten ansonsten den Messwerten der Gruppe mit niedrigeren Proliferationsraten (Abb. 18:  $t_1=0,217 \pm 0,051$ ;  $t_2=0,154 \pm 0,021$ ;  $t_3=0,238 \pm 0,028$ ).

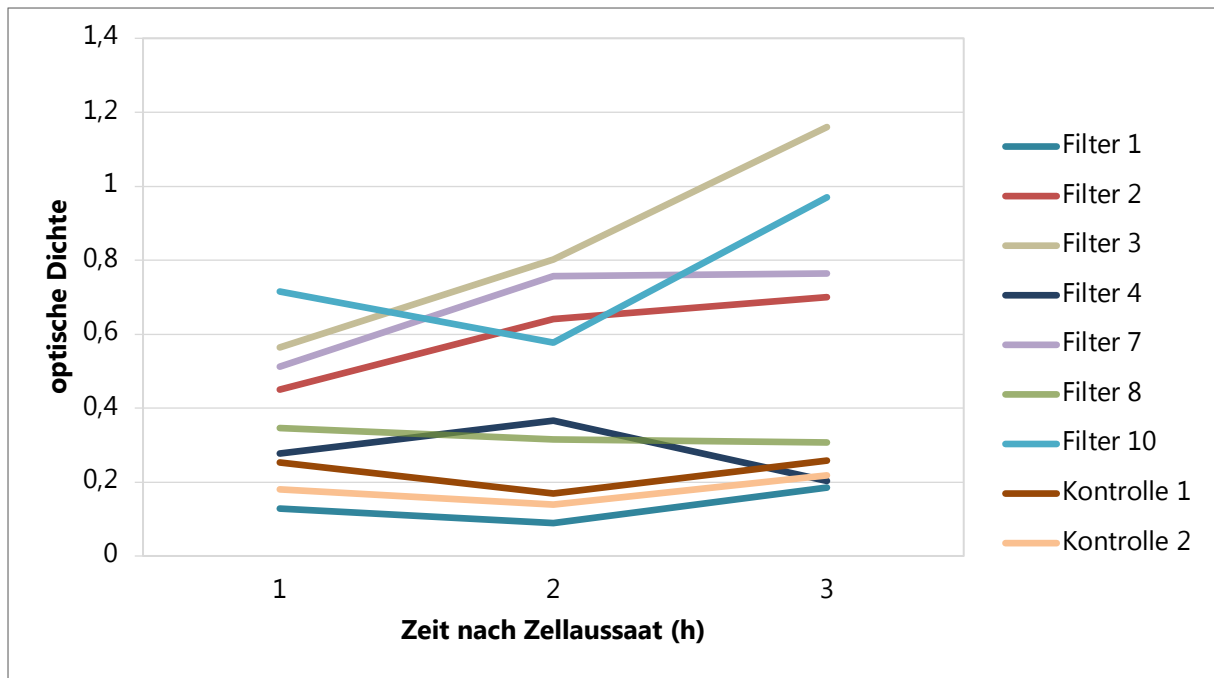


Zeit nach Zellaussaat (h)	24	48	72
Filter 1	0,128	0,089	0,185
Filter 2	0,45	0,641	0,700
Filter 3	0,564	0,802	1,160
Filter 4	0,277	0,366	0,203
Filter 7	0,512	0,756	0,764
Filter 8	0,346	0,316	0,307
Filter 10	0,716	0,577	0,970
Filter / Versuchsgruppe (MW)	0,428 ± 0,195	0,507 ± 0,259	0,612 ± 0,386
Kontrolle 1	0,253	0,169	0,258
Kontrolle 2	0,181	0,139	0,218
Kontrolle (MW)	0,217 ± 0,051	0,154 ± 0,021	0,238 ± 0,028

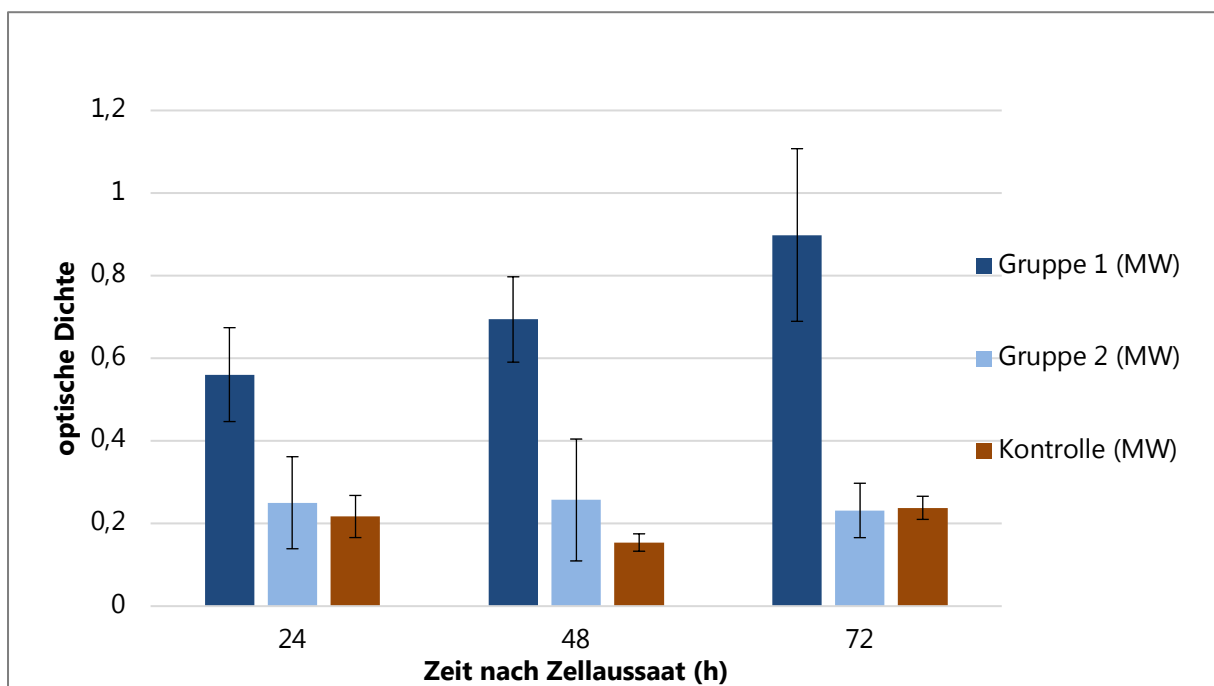
Tabelle 3A: WST-1 Proliferationsassay der kultivierten Fibroblasten (Filter 1, 2, 3, 7, 8, 10) t<sub>1</sub>=24h, t<sub>2</sub>= 48h und t<sub>3</sub> = 72h nach Zellaussaat unter Angabe der optischen Dichte.

Zeit nach Zellaussaat (h)	24	48	72
Filter 2	0,45	0,641	0,700
Filter 3	0,564	0,802	1,160
Filter 7	0,512	0,756	0,764
Filter 10	0,716	0,577	0,970
Filter Gruppe 1 (MW)	0,561 ± 0,114	0,694 ± 0,103	0,899 ± 0,209
Wachstumsverhalten (MW)		24%	60%
Filter 1	0,128	9%	19%
Filter 4	0,277	37%	20%
Filter 8	0,346	32%	31%
Filter Gruppe 2 (MW)	0,250 ± 0,111	0,257 ± 0,148	0,232 ± 0,066
Wachstumsverhalten (MW)		3%	-7%
Kontrolle 1	0,253	0,169	0,258
Kontrolle 2	0,181	0,139	0,218
Kontrolle (MW)	0,217 ± 0,051	0,154 ± 0,021	0,238 ± 0,028
Wachstumsverhalten (MW)		-29%	10%

Tabelle 3B: WST-1 Proliferationsassay der FB mit Gruppierung der Filter (Gruppe 1: Filter 2,3,7 & 10 ; Gruppe 2: Filter 1,4 & 8) und Errechnung des jeweiligen Mittelwerts (MW) mit Angabe der Standardabweichung; zusätzliche Angabe des Wachstumsverhaltens der Zellreihen zwischen 24h und 48h und 48 und 72h.



**Abbildung 17: WST-1-Proliferationsassay der Fibroblasten: Messung der optischen Dichte alle 24h ( $t_1=24h$ ,  $t_2=48h$ ,  $t_3=72h$ ) nach Zellaussaat;**



**Abbildung 18: Mittelwerte des WST-1 Proliferationsassays der Fibroblasten der Gruppe 1, Gruppe 2 und der Kontrollgruppe: Mit einer optischen Dichte von  $0,561 \pm 0,114$  grenzt sich der Mittelwert der Gruppe 1 (dunkelblau) von Gruppe 2 (hellblau) und der Kontrollgruppe (braun) ab. In Gruppe 1 es kam zu einer Extinktionssteigerung von 24% zwischen 24h und 48 h ( $=t_2$ ) und 60% zwischen 24 und 72h ( $=t_3$ ). In Gruppe 2 wurde bei  $t_2$  eine Extinktionssteigerung von 3% und bei  $t_3$  ein Extinktionsverlust von 7% gemessen. In der Kontrollgruppe wurde bei  $t_2$  ein Extinktionsverlust von 29% und bei  $t_3$  eine Extinktionssteigerung von 10% gemessen.**

*Als Fehlerbalken fungieren die errechneten Standardabweichungen (Tabelle 3B)*

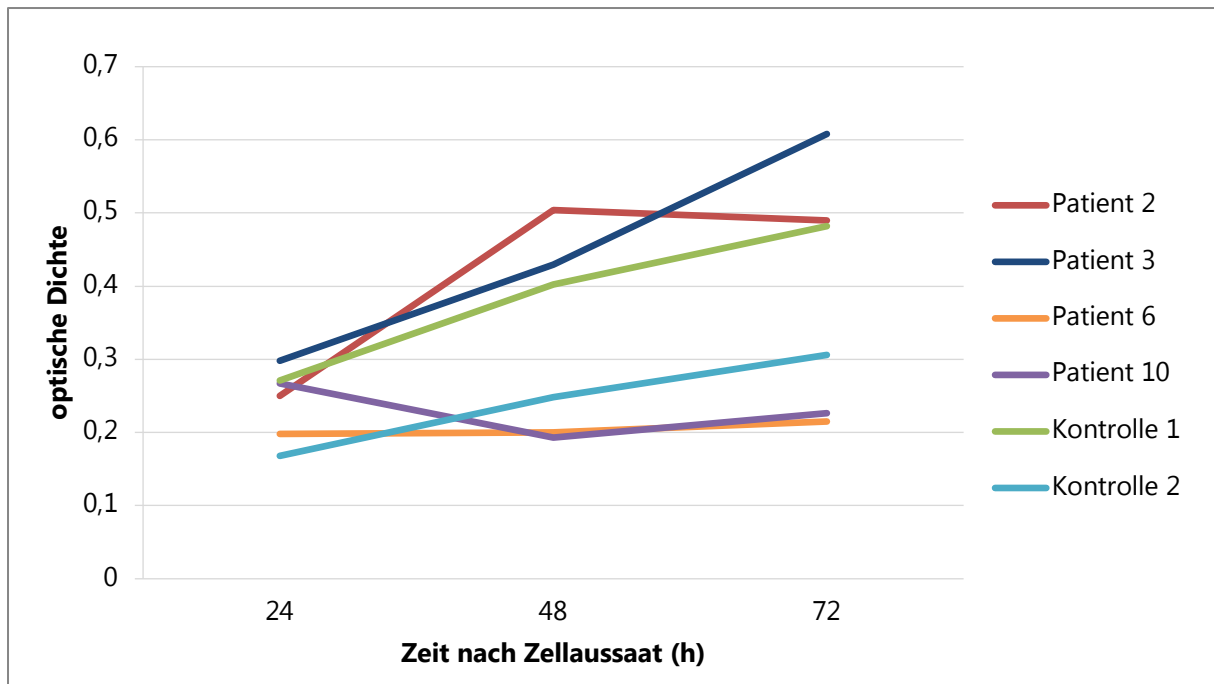
### 3.3.2 Wachstumsverhalten der Endothelzellen

Die Extinktionsmessung des WST-1-Reagenz der Endothelzellen aus dem Vollblut zeigte ebenfalls einen positiven Wachstumsverlauf (Abb. 19). Bei  $t_1$  wurde in der Versuchsgruppe eine optische Dichte von  $0,253 \pm 0,042$  gemessen. In der Kontrollgruppe lag der Mittelwert für die optische Dichte nach  $t=24$  h bei  $0,220 \pm 0,073$ . In den darauffolgenden Messtagen kam es in der Versuchsgruppe zu einem Extinktionsanstieg um 31% bei  $t_2$  und 52% bei  $t_3$ . Im Vergleich dazu zeigte die Kontrollgruppe einen Anstieg der Extinktion um 48% bei  $t_1$  und 79% bei  $t_3$  (Abb. 20).

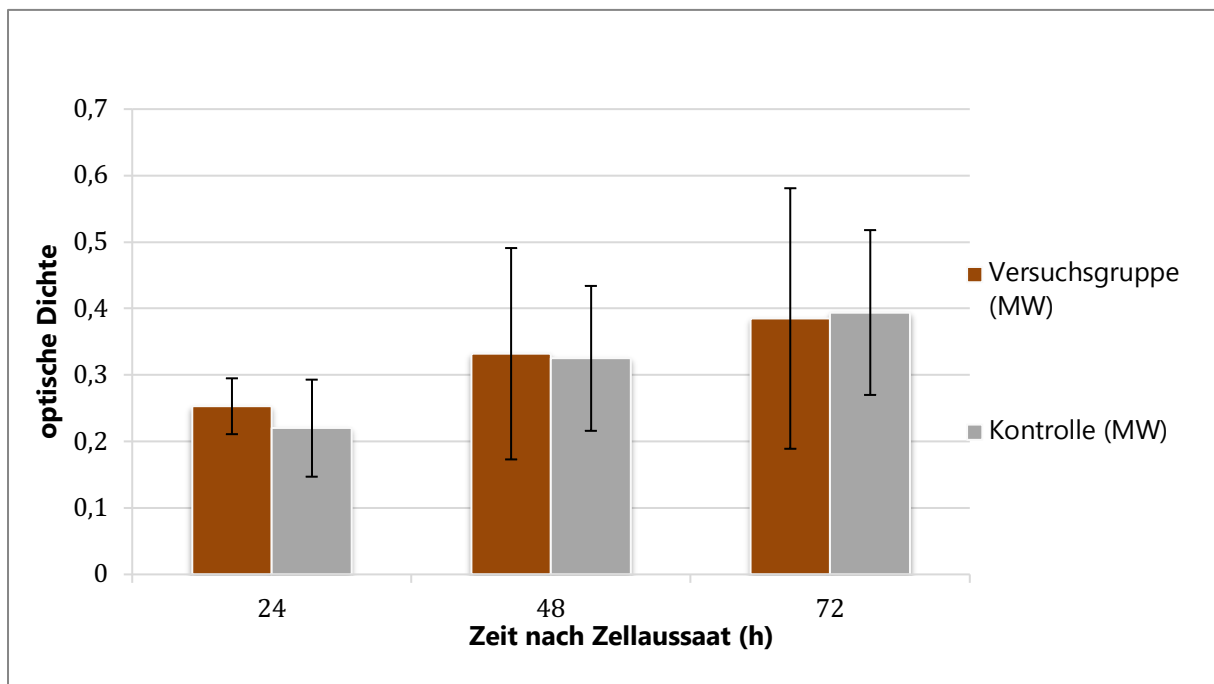
Die Wachstumsraten der Endothelzellen zeigten zu keinem Zeitpunkt eine höhere Wachstumsrate als die der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind nach Überprüfung in einem t-Test jedoch nicht signifikant (Tab. 1 im Anhang).

<b>Zeit nach Zellaussaat (h)</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>
<b>Patient 2</b>	0,25	0,504	0,49
<b>Patient 3</b>	0,298	0,429	0,608
<b>Patient 6</b>	0,198	0,2	0,215
<b>Patient 10</b>	0,267	0,193	0,226
<b>Mittelwert (MW)</b>	$0,253 \pm 0,042$	$0,332 \pm 0,159$	$0,385 \pm 0,196$
<b>Wachstumsverhalten (MW)</b>		31%	52%
<b>Kontrolle 1</b>	0,271	0,402	0,482
<b>Kontrolle 2</b>	0,168	0,248	0,306
<b>Kontrolle (MW)</b>	$0,220 \pm 0,073$	$0,325 \pm 0,109$	$0,394 \pm 0,124$
<b>Wachstumsverhalten (MW)</b>		48%	79%

**Tabelle 4: WST-1 Proliferationsassay der kultivierten Endothelzellen aus dem Vollblut nach  $t_1=24$ h,  $t_2= 48$ h und  $t_3 = 72$ h nach Zellaussaat unter Angabe der optischen Dichte (Extinktion) und jeweiliger Errechnung des Mittelwerts (MW) mit Angabe der Standardabweichung; Zusätzliche Angabe des Wachstumsverhaltens der Zellreihen zwischen 24h und 48h und 48 und 72h.**



**Abbildung 19: WST-1 Proliferationsassay der kultivierten Endothelzellen nach  $t_1=24h$ ,  $t_2= 48h$  und  $t_3 = 72h$  nach Zellaussaat. Patienten 1,4,5,7,8,9 wurden aufgrund des fehlenden Wachstums nicht in diese Abbildung eingeschlossen.**



**Abbildung 20: Mittelwerte des WST-1 Proliferationsassays der kultivierten Endothelzellen der Versuchsgruppe (grau) im Vergleich zur Kontrollgruppe (braun). Die Ergebnisse der Versuchsgruppe ergaben bei  $t_2$  einen Extinktionsanstieg um 31% und einen Anstieg um 52% bei  $t_3$ . Im Vergleich dazu zeigte die Kontrollgruppe dagegen einen Anstieg der Extinktion um 48% bei  $t_1$  und 79% bei  $t_3$ .**

*Als Fehlerbalken fungieren die errechneten Standardabweichungen (Tabelle 4)*

### **3.4 Immunhistochemische Analyse**

#### **3.4.1 Nachweis der Zellbesiedelung**

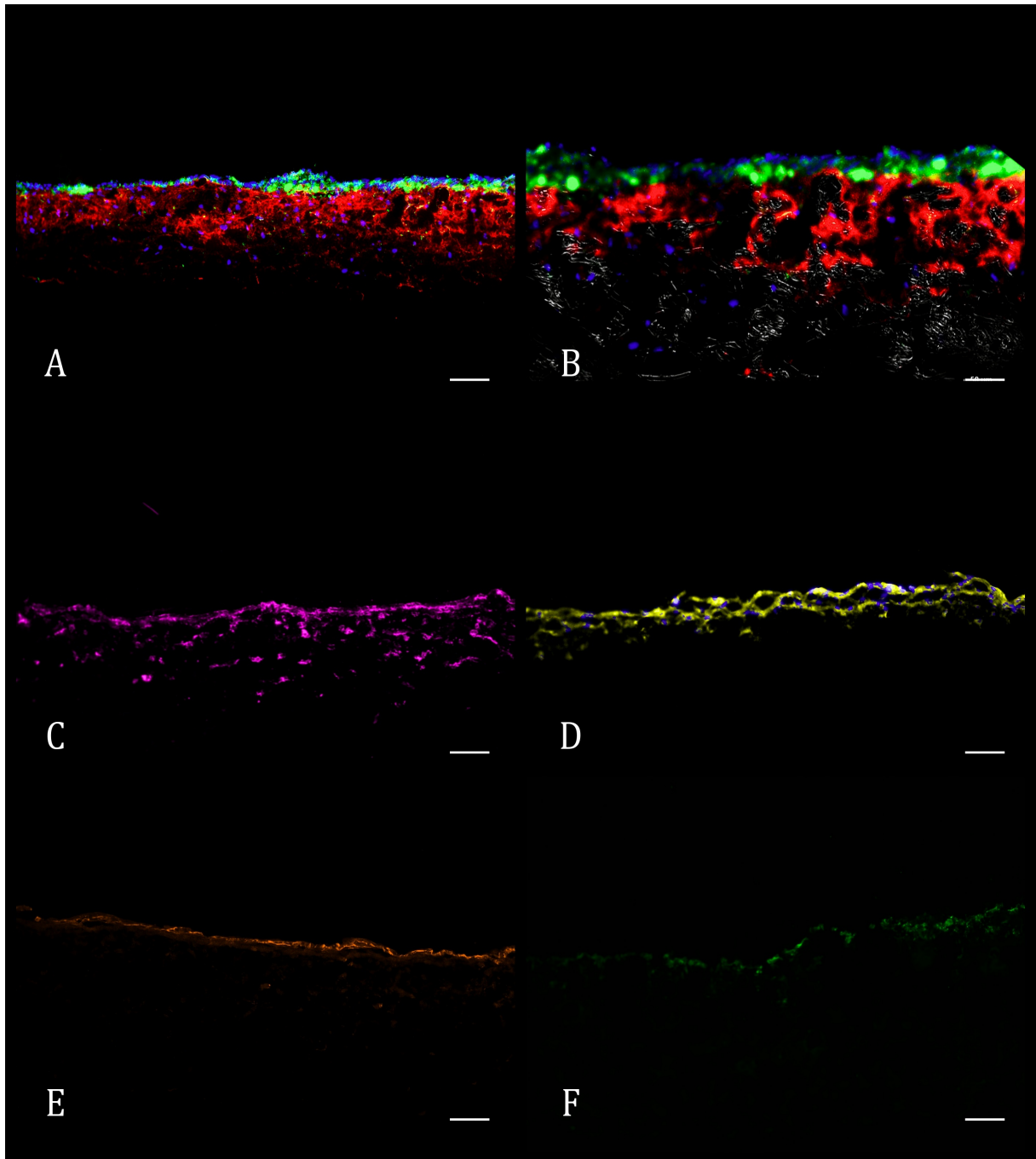
Vor der Anfärbung der Schnitte konnte bereits eine Zellbesiedelung auf den PU-Gerüsten sowohl makro- als auch mikroskopisch unter dem Lichtmikroskop festgestellt werden. Durch die Immunfluoreszenzfärbung gegen TE-7 wurde ein stark positives TE-7 Signal im Mikroskop sichtbar (Ann 21 A+B). Dies spricht für eine mehrschichtige FB-Oberflächenbesiedelung, welche sich als eine konfluente Zellschicht darstellte. Die zusätzliche Besiedelung mit den zu dem jeweiligen Spender korrespondierenden Endothelzellen wurde durch die positive Färbung gegen vWF visualisiert. Hier zeigte sich eine kontinuierliche Endothelzellschicht. Durch die gleichzeitige Färbung der beiden Antikörper kamen zwei sich zueinander abgrenzende Zellschichten zur Visualisierung.

#### **3.4.2 Nachweis der Extrazellulären Matrix**

Die Entwicklung der EZM wurde durch eine positive Färbung gegen die jeweiligen Proteine nachgewiesen. Es zeigte sich eine positive Anfärbung gegen Elastin (Abb. 21C). Auch bei der Färbung gegen Laminin (Abb. 21D) wurde eine durchgehend kompakte Zellschicht mit kraftvollem Signal visualisiert. Ebenfalls konnte die Anwesenheit von Collagen IV (Abb. 21E) und Fibronectin (Abb. 21F) nachgewiesen werden.

Die Aufnahmen der lichtmikroskopischen Überlagerungen der besiedelten Patches sind dem Anhang zu entnehmen (Abb. 2-5 im Anhang). Hier ist bei der Färbung gegen Laminin eine gewisse Hintergrundfärbung im Bereich des Polyurethanscaffolds nicht sicher auszuschließen. Bei allen anderen Antikörpern konnte eine unspezifische Hintergrundfärbung des Scaffolds ausgeschlossen werden.

Die Negativproben sind ebenfalls dem Anhang zu entnehmen und zeigten keine Fluoreszenz bei vorheriger alleiniger Inkubation mit den sekundären Antikörpern (Abb. 1 im Anhang).



**Abbildung 21: Visualisierung durch Immunfluoreszenz der mit Zellen besiedelten PU-Patche: (A+B) Kompakte Zellschicht aus TE-7 positiven Fibroblasten (rot) mit oberflächlicher vWF positiver Endothelzellschicht (grün) und visualisierten Kernen mittels DAPI-Färbung (blau); Die Formation der Extrazellulären Matrix wird durch Färbung gegen (C) Elastin (Magenta), (D) Laminin (gelb), (E) Collagen IV (orange) und (F) Fibronectin (grün) visualisiert; Maßstab (A,C-F): 100µm; (B): 50µm;**

*Eine Hintergrundfärbung der Antikörper Laminin ist nicht sicher auszuschließen (Abbildung 4 im Anhang)*

### **3.5 Rasterelektronenmikroskopie**

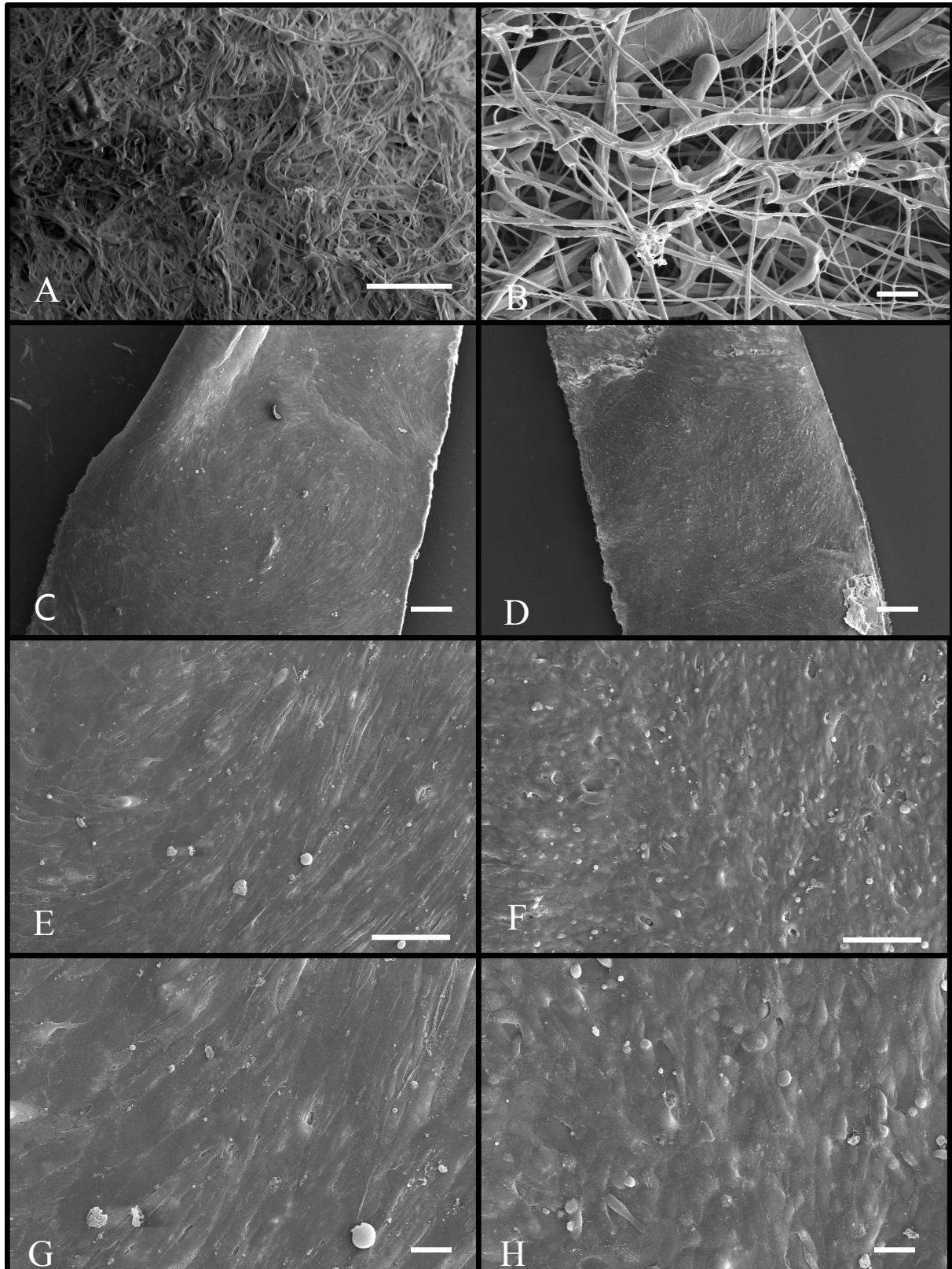
#### **3.5.1 Nativproben**

Die Analyse der nativen Gerüste zeigte unter dem Rasterelektronenmikroskop willkürlich angeordnete PU-Fasern. Die Oberfläche präsentierte sich insgesamt gleichförmig strukturiert. Die Fasern wurden mit einem mittleren Durchmesser von  $2,6 \pm 1,0 \mu\text{m}$  gemessen (Abb. 22A+B).

#### **3.5.2 Zellbesiedelung der Polyurethangerüste**

Die Polymerscaffolds präsentierten sich nach der Zellbeschichtung durchgehend von einer konfluierenden Zellschicht überzogen. Die Zellen zeigten sich regelmäßig über das Gerüst verteilt. Es waren keine Zellagglomerate nachweisbar. Eine Schicht fusiformer Zellen konnte nach  $t=7$  Tagen der statistischen FB-Besiedelung nachgewiesen werden (Abb. 22E+G).

Nach der zusätzlichen Endothelzellbesiedlung und Kultivierung zeigte die Oberfläche eine gleichmäßige und konfluierende Formation. Das typische Kopfsteinpflasterrelief wurde in der gesamten Zellschicht nachgewiesen (Abb. 22F+H).

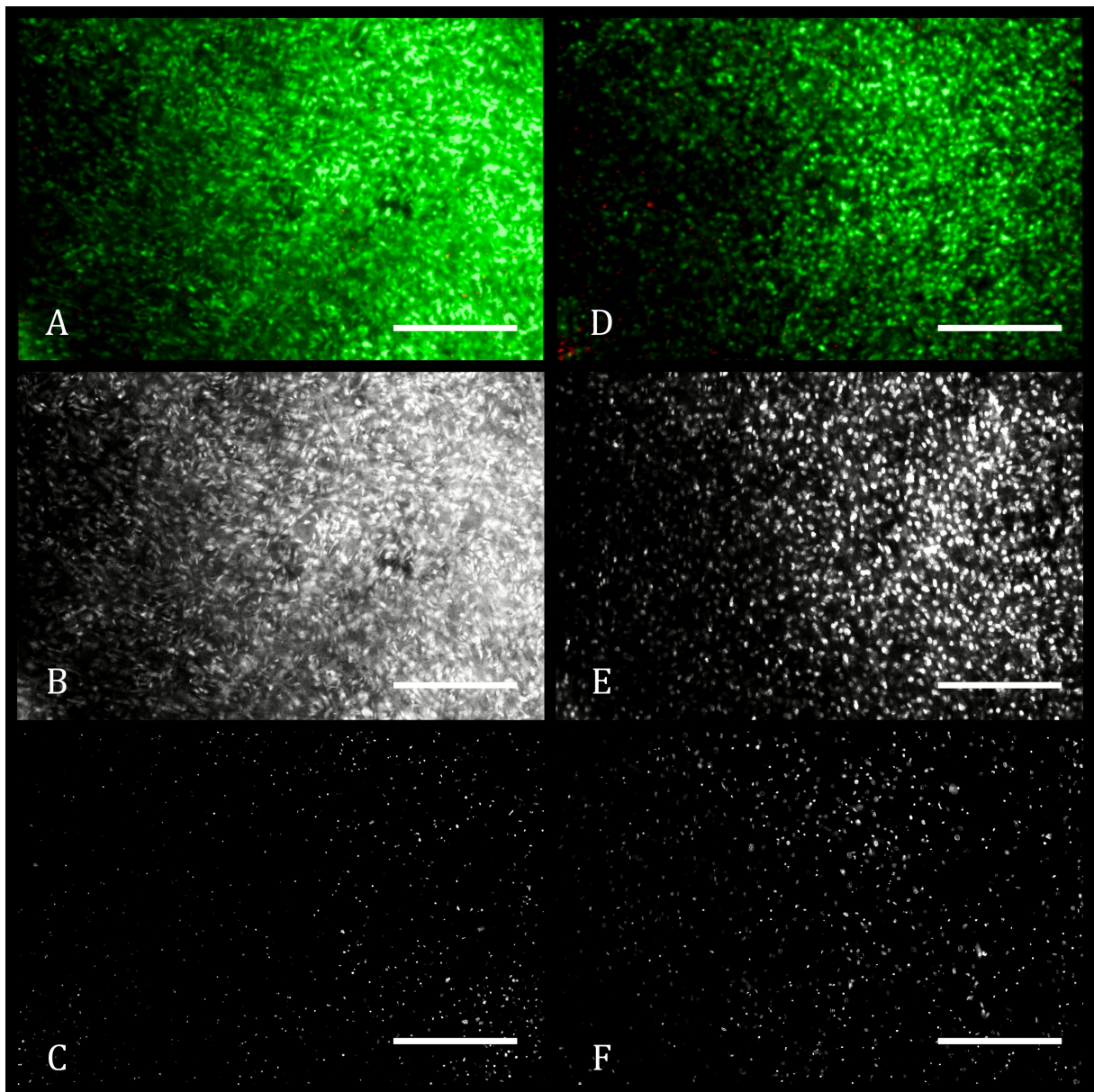


**Abbildung 22: Rasterelektronenmikroskopie der PU-Patches: (A+B) Nativproben der Polyurethangerüste mit randomisiert angeordneten Fasern und einem Durchmesser von  $2,6 \pm 1,0 \mu\text{m}$ ; (C) Gesamtaufnahme des besiedelten FB Patch; (D) Gesamtaufnahme des besiedelten FB Patch + EC Schicht; (E+G) Fusiforme Zellschicht der besiedelten Fibroblasten nach sieben Tagen Zellkultur; (F+H) gleichmäßige Endothelzellschicht mit typischem Pflastersteinrelief, welches die kompakte FB-Schicht komplett bedeckt; Maßstab (C+D): 200  $\mu\text{m}$ ; (A,E,F): 100 $\mu\text{m}$ ; (B,G,H): 20 $\mu\text{m}$ .**



### 3.6 Vitalitätsassay

Die kultivierten Zellen auf dem PU-Material wurden mittels Life / Dead®-Färbung visualisiert. Bei der Bildanalyse zeigten sich bei einer Wellenlänge von 540 nm  $88,9 \pm 9,9\%$  grün fluoreszierende Zellen, was auf eine hohe Zellvitalität hindeutet. Bei einer Wellenlänge von 485 nm kamen die abgestorbenen Zellen zur Darstellung (Abb. 23 C+F), bei denen das Reagenz Syto9 nicht durch die vitale Zellmembran penetrierte. Konfluente Schichten von vitalen Zellen wurden in allen getesteten Proben nachgewiesen (Abb. 23 B+E).



**Abbildung 23:** Life / Dead® Färbung von besiedelten PU-Patches; (A-C) Visualisierung der besiedelten Patches mit FB; (D-F) Visualisierung der besiedelten Patches mit FB und EC; (A+D) Fluoreszierende vitale (grün) und abgestorbene (rot) Zellen; zusätzliche Darstellung vitalen (B+E) und abgestorbenen (C+F) Zellen; Maßstab (A-F): 100  $\mu\text{m}$

### 3.7 Patientendaten und Statistische Auswertung

Die Patientendaten, inklusive Lebensalter, Bypasszeit sind im Folgenden tabellarisch dargestellt. Ferner wurde aus den zusätzlich erhobenen Patientendaten der jeweilige EuroSCORE II errechnet (Tab. 5) [64]. Das Durchschnittsalter der Spender ergab  $66,7 \pm 10,1$  Jahre, die mittlere Bypasszeit ergab  $129,3 \pm 38,4$  min und der EuroSCORE II einen Mittelwert von  $1,7 \pm 1,1$  (Tab. 6).

Filter /Patient	Lebensalter	Bypasszeit (t=min)	EuroSCORE II (%)
1	63	120	1,12
2	64	173	1,08
3	66	147	1,46
4	84	83	2,36
5	70	89	1,21
6	74	87	3,89
7	56	144	0,68
8	53	126	0,76
9	79	123	3,01
10	58	201	1,27
<b>MW ± STABW</b>	$66,7 \pm 10,1$	$129,3 \pm 38,4$	$1,7 \pm 1,1$

**Tabelle 5: Patientenkollektiv der Studie mit Lebensalter, Bypasszeit und EuroSCORE II.**

Filter /Patient	Wachstumsverhalten FB 24-72h	Wachstumsverhalten EC 24-72h
1	0,445	
2	0,556	0,96
3	1,057	1,04
4	-0,267	
5		
6		0,086
7	0,492	
8	-0,113	
9		
10	0,355	-0,154
<b>MW ± STABW</b>	$0,367 \pm 0,441$	$0,483 \pm 0,606$

**Tabelle 6: Darstellung der Messungen des WST-1 Assays: Das Wachstumsverhalten der FB und EC zwischen 24-72h ist die prozentuale Veränderung der Extinktionswerte zwischen 24h und 72h. Dies wird als Maß für die Zellproliferation angesehen.**

Die Zusammenhänge zwischen Lebensalter und Zellwachstum, Bypasszeit und Zellwachstum, EuroSCORE II und Zellwachstum wurden in einem Streudiagramm visualisiert (Abb. 24 und 25). Die hierfür verwendeten Datenpunkte beziehen sich auf Tab. 5 und Tab. 6. Hierbei wird sich lediglich auf die Darstellung des Wachstumsverhaltens der beiden Zellreihen zwischen  $t=24h$  und  $t=72h$  bezogen (Abb. 24). Der Korrelationskoeffizient nach Bravais Pearson wurde ebenfalls in die Darstellung der Streudiagramme integriert. Die tabellarische Darstellung der vollständigen Korrelationsanalyse mit den Messwerten des WST-1 Assays zu den Zeitpunkten  $t=24h$ ,  $48h$  und  $72h$  erfolgt im Anhang (Tab. 2) und wird nachfolgend besprochen.

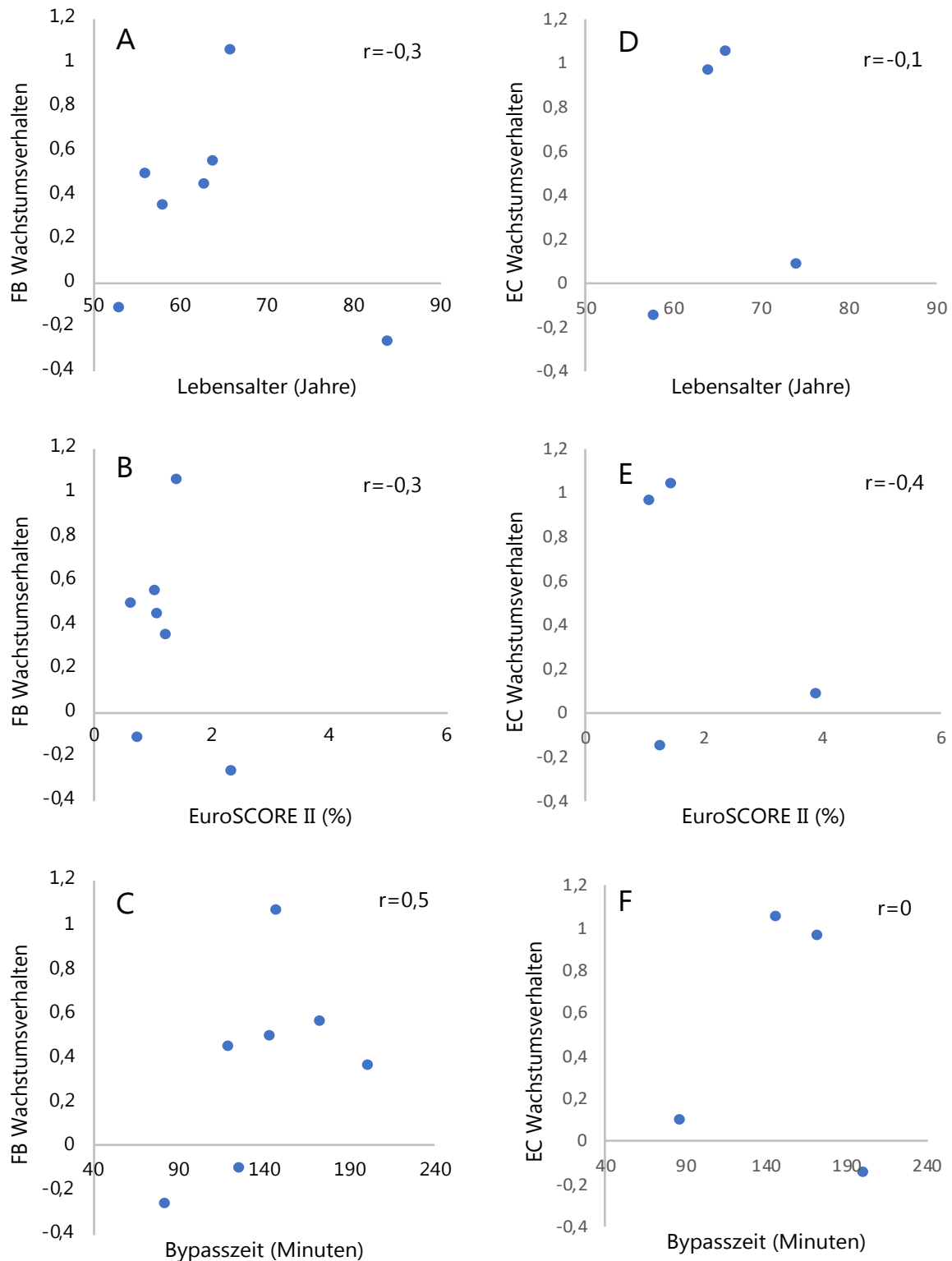
Zwischen EuroSCORE II und Lebensalter besteht eine statistisch signifikante positive Korrelation ( $r=0,8$ ) (Tab. 2 im Anhang).

Zwischen Lebensalter und dem FB Wachstum zeigt sich eine schwache negative Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r=-0,3$  (Abb. 24 A). Es besteht zwischen Lebensalter und FB Wachstum zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Zusammenhang (Tab. 2 im Anhang).

Zwischen EuroSCORE II und dem FB Wachstum zeigt sich eine schwache negative Korrelation mit  $r=-0,3$  (Abb. 24 B). Es besteht zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Zusammenhang (Tab. 2 im Anhang).

Zwischen Bypasszeit und FB Wachstum zeigt sich eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r=0,5$  (Abb. 24 C). Zwischen FB Wachstum nach  $t=24h$  und Bypasszeit besteht eine statistisch signifikante positive Korrelation ( $r=0,8$ ). Ansonsten besteht zu keinem anderen Zeitpunkt ein signifikanter Zusammenhang (Tab. 2 im Anhang).

Zur Komplettierung der Auswertung erfolgte die Darstellung der Ergebnisse der EC Kultur. Die schwache Aussagekraft bei fehlenden Datenreihen sollte hierbei jedoch betont werden. Zwischen Lebensalter und EC Wachstum zeigt sich eine schwach negative bis keine Korrelation mit  $r=-0,1$  (Abb. 24 D). Zwischen EuroSCORE II und EC Wachstum besteht eine schwach negative Korrelation mit  $r=-0,3$  (Abb. 24 E). Es zeigt sich keine Korrelation zwischen Bypasszeit und EC Wachstum mit  $r=0$  (Abb. 24 F). Es besteht zwischen den erhobenen Messwerten und den patientenspezifischen Parametern zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Zusammenhang (Tab. 2 im Anhang).



**Abbildung 24: Streudiagramm mit Korrelationskoeffizienten nach Bravais Pearson: (A) schwach negative Korrelation zwischen FB Wachstumsverhalten und Lebensalter; (B) schwach negative Korrelation zwischen FB Wachstumsverhalten und EuroSCORE II; (C) positive Korrelation zwischen FB Wachstumsverhalten und Bypasszeit; (D) sehr schwach negative Korrelation zwischen EC Wachstumsverhalten und Lebensalter; (E) negative Korrelation zwischen EC Wachstumserhalten und EuroScore II; (F) keine Korrelation zwischen EC Wachstumsverhalten und Bypasszeit.**

*Das Wachstumsverhalten der FB und EC zwischen 24-72h bezieht sich auf die prozentuale Veränderung der Extinktionswerte zwischen  $t=24h$  und  $t=72h$ .*

## 4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, eine neuartige Zellquelle für das kardiovaskuläre Tissue Engineering (TE) zu evaluieren und die isolierten Zellen als Konzepterprobung auf die Möglichkeit einer zukünftigen Anwendung im Bereich des TE zu testen.

Seit mehr als 50 Jahren werden Herzklappen bei Patienten fortgeschrittenen Alters durch mechanische oder biologische Prothesen ersetzt [69]. Auch Neugeborene und junge Patienten mit einem Herzfehler sollten im Hinblick auf die bestmögliche Behandlung unbedingt berücksichtigt werden [140]. Sowohl die Implantation von vaskulären Gefäßprothesen, als auch die mechanischer oder biologischer Klappen geht jedoch mit Nachteilen einher. Spätkomplikationen beinhalten die Degeneration der Prothese mit progressiver Obstruktion, fehlendem Wachstumspotential, Infektionsanfälligkeit und Empfänglichkeit für thromboembolische Komplikationen. Insbesondere im Hinblick auf die pädiatrischen Krankheitsbilder sind diese Einschränkungen gravierend [141-142].

Tissue Engineering verfolgt den Ansatz, die aktuellen Limitationen einer bestehenden Prothese, wie die lebenslange Antikoagulation, das erhöhte Infektionsrisiko und die fehlende Reparationsfähigkeit, zu überwinden. Auch wirtschaftliche Faktoren in Bezug auf eine potentiell längere Haltbarkeit und die dazu führende Kostenreduktion spielen eine Rolle [143, 144]. Die Ergebnisse dieser Arbeit, mit dem Ziel der Konzepterprobung einer neuen Zellquelle, um die derzeitigen Einschränkungen wie Wachstum und Differenzierungspotential zu umgehen, werden nachfolgend diskutiert.

### 4.1 Hohe Verfügbarkeit der Zellquelle

Da alle Teile der Herz-Lungen-Maschine (HLM) durch den Kontakt mit Blut nur als Einwegartikel auf dem Markt verfügbar sind, führt deren Entsorgung zu einem hohen Aufkommen von nutzbarem Material. Die Bereitstellung der Kardiotomiereservoirs (KR) für die Versuchsdurchführung im Rahmen dieser Arbeit konnte somit problemlos ermöglicht werden. Die Abtrennung und die darauffolgende Aufarbeitung von Teilen der HLM stand unter keinen ethischen Bedenken.

Auch für die Zukunft kann die Bereitstellung dieser Materialien für weitere Versuchsreihen gewährleistet werden: Wie die Deutsche Herzstiftung in ihrem Herzbericht von 2015 bekanntgab, wurden 2015 in Deutschland rund 100.000 Eingriffe am offenen Herzen

vorgenommen [145]. Diese Zahl ist seit einigen Jahren konstant. Aufgrund der aktuellen Gegebenheiten benötigen mehr als die Hälfte aller Operationen durch die Stilllegung des Herzens einen extrakorporalen Bypass. So lässt sich rechnerisch erschließen, dass momentan pro Tag mehr als 100 Kardiotomiereservoirs nach herzchirurgischen Operationen in Deutschland anfallen [146, 147]. Diese hohe Zahl der verworfenen Materialien spricht für die zukünftige Bereitstellung der Materialien für weitere Versuche. Der wachsende Trend von „off-pump“ Operationen am Herzen sollte dennoch in dieser Rechnung nicht unbeachtet gelassen werden. Der aortokoronare Bypass am schlagenden Herzen wird inzwischen vermehrt durchgeführt und beschreibt die Operation ohne kardiopulmonalen Bypass. Die aktuelle Studienlage beschreibt allerdings minimale Auswirkung auf die Überlebenszeit der Patienten ohne Verwendung einer HLM [148]. Dennoch sehen einige Chirurgen von der Bypass-Operation mit einer HLM ab, da man inzwischen weiß, dass es durch Anlage der Zugänge an der Aorta oder Leistengefäßen durch Manipulation zu vermehrten Embolien kommt [149]. Bei dem konventionellen Aorten- oder Mitralklappenersatz ist weiterhin eine HLM von Nöten und so kann die zukünftige Gewinnung von Zellen aus diesen Operationen eine Rolle spielen [150].

## **4.2 Methodik und Handhabung**

Setzt man die neu untersuchte Isolationsmethodik von sowohl Fibroblasten, als auch Endothelzellen in den direkten Vergleich zu den bewährten Verfahren, überzeugt diese in einigen Punkten. Zum einen zeichnet sich die Methodik durch ein einfaches Isolationsverfahren aus. Verglichen mit der Isolation aus Venen- oder Arteriensegmenten, beweist sich diese als einfach zu erlernen und weniger zeitintensiv. Zusätzlich wird nur eine geringfügige Menge von Einmalartikeln verwendet, was wiederum Kosten sparen könnte. Außerdem wird im Rahmen der Isolation auf eine Enzymexposition und die damit verbundenen potentiellen Zellschäden verzichtet [151]. Darüber hinaus ist für die Erlangung der benötigten Materialien oder Gewebeproben kein zusätzlich geplanter invasiver Eingriff notwendig, wie es bei Verfahren, wie der Gewinnung von Zellen aus dem Knochenmark der Fall ist [116, 122]. Sofern die Indikation einer Operation mit kardiopulmonalem Bypass gestellt ist, ist diese unabdingbar und die Bereitstellung der KRs postoperativ gegeben. Eine mögliche Argumentation gegen die evaluierte Zellquelle wäre, dass diese nur bei Mehrfacheingriffen die Möglichkeit der Anwendung im Bereich des TE darstellt.

### **4.3 Isolation von Endothelzellen aus dem Vollblut**

Endothelzellen konnten im Rahmen dieser Arbeit durch immunzytologische Färbungen eindeutig identifiziert werden. Dennoch bleibt die Bilanz der Endothelzellisolation aus dem Vollblut ernüchternd. In lediglich n=4 Zellreihen konnte eine ausreichende Menge für weitere Analysen und dementsprechende Färbung kultiviert werden. Die Zellen konnten einzig aus dem Blut der Patienten isoliert werden und somit ist die Verwertung der KRs in Bezug auf die Endothelzellen nicht von Bedeutung.

Zum anderen kommt die Frage nach dem Ursprung der isolierten Endothelzellen auf. Die These von Dotsenko et al. bekräftigt, dass es zu einer Freisetzung von endothelialen Vorläuferzellen (EPC) aus dem Knochenmark durch herzchirurgische Operationen kommt [152]. Zudem beschreibt Ruel et al. eine vermehrte Freisetzung von EPC bei Operationen mit einer Herz-Lungen-Maschine [153]. Dies beruht auf der Annahme, dass verschiedene Formen von vaskulärem Stress zu einer vermehrten Freisetzung der EPCs aus dem Knochenmark führen [154]. Basierend auf diesem Wissen wurden bereits kolonieformende Endothelzellen und mesenchymale Stammzellen von Neugeborenen unter der Therapie einer extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO) isoliert und kultiviert [155]. Für den klinischen Einsatz sind EPCs von großer Bedeutung. Zum einen kann durch die gemessenen Konzentrationen von EPCs im Blut eine Aussage über das kardiovaskuläre Risikoprofil der Patienten getroffen werden. Zum anderen finden sie auch im Bereich der regenerativen Medizin ihren Platz. So wurden diese Zellen von Cebotari et al. bereits auf dezellularisierte humane Pulmonalklappen besiedelt und autolog erfolgreich implantiert [156, 157].

Des Weiteren hat Ritz et al. festgestellt, dass das Level von EPCs erst nach einem Tag bzw. sieben Tagen nach einem Trauma signifikant ansteigt [25]. Eine erneute Blutabnahme eine Woche nach dem herzchirurgischen Eingriff könnte so ebenfalls einen Erfolg auf die quantitative Ausbeute der Endothelzellkultur haben.

Auf der anderen Seite kann sich nicht nur der Zeitpunkt der Blutentnahme, sondern auch das Alter der Patienten auf die EPC Konzentration auswirken. So stellten zum Beispiel Scheubel et al. einen Zusammenhang zwischen EPC Konzentrationen im Blut und dem Alter der Patienten her [158]. Es wurde beschrieben, dass trotz signifikanten Anstiegs der EPC Konzentration während einer herzchirurgischen Operation, das Alter einen wichtigen limitierenden Faktor für die Mobilisierung der Zellen darstellt. So wurde auch im Zusammenhang mit dieser Arbeit vermutet, dass das Lebensalter der jeweiligen Spender mit dem positiven Wachstumsverhalten der Endothelzellkultur in Zusammenhang stehen könnte. Hier konnte

jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Lebensalter und Endothelzellwachstum ermittelt werden. Ferner lässt sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Endothelzellkultur, EuroSCORE II und Bypasszeit feststellen. Diese Ergebnisse können somit nicht mit denen von Scheubel et. al verglichen werden [158]. Möglicherweise führt ein niedriger EuroSCORE II und somit auch ein niedriges Patientenalter zu einer Zellkultur mit höheren Proliferationsraten. Um Aussagen diesbezüglich treffen zu können wäre eine deutlich größere Anzahl von isolierten EC notwendig gewesen.

Ferner wurde in der Vergangenheit die Schwierigkeit der Kultivierung von Endothelzellen beschrieben [159]. So sind bereits Ansätze verfolgt worden, die die Verwendung von magnetischer Durchflusszytometrie nutzten, um reine Endothelzellpopulationen herzustellen [160]. Dieses Verfahren könnte in Bezug auf diese Arbeit sowohl eine positive Auswirkung auf die Zellidentifikation, als auch auf das Zellwachstum haben. Da noch zu evaluieren bleibt, ob die Zellen aus dem Knochenmark freigesetzt wurden oder als Folge einer erhöhten Spannung an der Gefäßwand freigesetzt wurden, bleibt die Frage, ob es sich um EPC oder ausdifferenzierte Endothelzellen handelt, am Ende dieser Arbeit offen.

#### **4.4 Isolation von Fibroblasten aus Filternetzen**

Im Gegensatz zu dem Wachstumsergebnis der Endothelzellen lieferten die Fibroblasten eine positivere Bilanz. Allerdings führte das Wachstum der Fibroblasten ausschließlich in der Kultur der feinporigen venösen Filternetze zum Erfolg. Dies lässt vermuten, dass sowohl die zirkulierenden Fibroblasten in der Blutbahn, als auch die abgesaugten Zellen aus dem operativen Gebiet von dem feinporigen Netz abgefangen werden. In der Auswertung mittels Streudiagramm zeigte sich ein Trend, der Schlüsse auf die Korrelation der Wachstumsraten der isolierten Fibroblasten mit verschiedenen Einflussfaktoren vermuten lässt: Die Proliferationsrate fiel mit steigendem Alter der Patienten ab. Dies könnte für eine Abnahme der Wachstumseigenschaften der Zellen mit steigendem Alter sprechen, wie es bereits vorbeschrieben wurde [161]. Zusätzlich wurde eine positive Korrelation gesehen, die höhere Proliferationsraten bei längerer Bypasszeit zeigte. Es ist allerdings nicht zu vermuten, dass dies Auswirkung auf die Nutzung der Zellen für spätere Einsätze haben könnte, da zum Wohl des Patienten eine möglichst kurze Operationszeit angestrebt wird.

Ferner viel auf, dass die Primärkultur der großporigen Filternetze zum Wachstum von vielen Zellen unterschiedlicher Morphologie führte. Dies könnte durch die Akkumulation von



verschiedenen Zelltypen, die aus dem chirurgischen Absauggebiet aspiriert wurden, erklärt werden. Zum einen wurde im Nachhinein die Anwesenheit von Epithelzellen in der Primärkultur als wahrscheinlich gesehen. Da diese Zellen resistent gegenüber Trypsin sind, ließen sich diese nur schwer ablösen und gingen dadurch womöglich für die weitere Kultur und immunzytologische Evaluation verloren [162].

Andere Proben zeigten die Formation von Zellkonglomeraten. Möglich wäre hier beispielsweise die Formation von Cardiosphären, wie von Davis et al. bereits beschrieben wurde [163]. In diesem Fall wurden die Zellen allerdings aus Myokardbiopsien isoliert. Diese kardialen Vorläuferzellen besitzen ein hohes regeneratives Potential und sind in der Lage, sich in Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen zu differenzieren. Smith et al. konnten zusätzlich beweisen, dass unter in vitro Bedingungen die Cardiosphären ein spontan kontrahierendes Herzgewebe mit potentieller Schrittmacherfunktion bildeten [164]. Diese Zellen sind potentiell dafür geeignet durch Injektion in infarzierte Myokardregionen die Regeneration des Herzens zu unterstützen [165-167].

Andererseits wurde in einigen Proben die Anwesenheit von glatten Muskelzellen, mittels Anfärbung vom SMHC-Myosin nachgewiesen, welches die Vermutung zulässt, dass es sich primär um glatte Muskelzellen handeln könnte. Eine Durchflusszytometrie oder Antikörperfärbung der Primärkultur könnte auch hier weitere Aussagen über die Präsenz anderer Zelltypen in der Zellkultur ermöglichen.

#### **4.5 Vergleich mit Kontrollgruppe und Patientendaten**

In Bezug auf die Wachstumsraten beider isolierter Zellreihen erreichte keine der Vergleichstestungen mit den Kontrollgruppen einen statistisch signifikanten Unterschied. Dabei könnte das Fehlen der Versuchsergebnisse, in denen es nicht zum Wachstum kam, von Bedeutung sein. Für die Fibroblasten ist in der Versuchsgruppe ein Wachstumserfolg von 70% (n=10) und für die Endothelzellen ein Wachstumserfolg von nur 40% (n=10) zu verzeichnen. Bei den Zellen aus den Venenfragmenten, die als Kontrollgruppe dienten, kam es bei 100% (n=2) zu einem Wachstumserfolg, welches Vermutungen über die Schmälerung des Wachstumserfolges der neu evaluierten Zellequelle zulässt. Da es sich um ein etabliertes Isolationsverfahren handelt, wurde auf die Notwendigkeit der Akzentuierung dieser Methodik verzichtet [168]. Eine Versuchszahl von n=2 wurde daher als ausreichend gesehen.

Im Hinblick auf die Parameter als mögliche Einflussfaktoren auf die Wachstumsraten wurden bereits deutliche Trends ersichtlich. Die Korrelationsanalyse ließ allerdings den Eindruck durch größtenteils fehlende statistische Signifikanz schmälern, welches erneut auf die fehlenden Datenreihen zurückgeführt werden kann. Ferner sollte erwähnt werden, dass der Korrelationskoeffizient von Lebensalter und EuroSCORE II einen engen und statistisch signifikanten Zusammenhang beschreibt. Da das Alter der Patienten in die Berechnung des Scores mit einfließt, überrascht dies nicht. Dennoch wurde diese Korrelationsanalyse als Teil der Arbeit belassen und kann als ein Maß der Korrektheit der erhobenen und errechneten Daten herangezogen werden. Bedauerlicherweise konnten keine Patientendaten für die Kontrollgruppe erhoben werden, da die Proben das Labor anonymisiert erreichten. Ein Vergleich der Kontrollgruppe mit den Patientendaten hätte weitere Vergleiche zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe ermöglicht. Die Entnahme von Venensegmenten und Kardiotomiereservoirs von denselben Spendern würde weitere Schlüsse über die Wachstumsqualitäten der entnommenen Zellen zulassen und diese Methodik einer weiteren Evaluation unterziehen. Dennoch liefert diese Arbeit den Beweis für die Möglichkeit der Zellkultur aus Kardiotomiereservoirs und somit für eine valide Methodik.

#### **4.6 Kompatibilität für den Einsatz im Tissue Engineering**

Als ersten Schritt zur Bewertung der Eignung für das TE der neuen Zellquelle wurden PU-Gerüste mit den Zellen besiedelt. Für die Konstruktion von autologen Prothesen wird ein stabiles Gerüst benötigt, welches biokompatibel ist und ein rasches Zellwachstum erlaubt. In dieser Arbeit wurde sich zur Verwendung von elektrogesponnenem Polyurethan als Polymer entschieden. Auch Laschke et al. werteten in diesem Zusammenhang die Biokompatibilität und Gefäßformation von Polyurethangerüsten unter in-vivo Bedingungen als erfolgreich [169]. Zusätzlich besteht bei der Verwendung von synthetischen Polymeren die Möglichkeit, mittels 3-D-Druck auf den Patienten zugeschnittene Klappen bzw. Gefäßprothesen anzufertigen [170, 171]. Im Zuge dieser Arbeit konnte mittels Vital/Letal Assay eine konfluente und vitale Zellschicht auf dem synthetischen Material nachgewiesen werden. So bestätigt sich die Kompatibilität der untersuchten Zellen mit dem PU Material, welches bereits in der Vergangenheit unter Laschke et al., Mackay et al. und Thierfelder et al. vielversprechende Ansätze lieferte [169, 170, 99].

Auch die Bildung von EZM ist essentiell zur Gewährleistung der Funktionalität von TE-Transplantaten. Trotz der Auffassung von Jockenhoevel et al., dass flussabhängiger mechanischer Stress zur Bildung von EZM erforderlich ist bzw. einen erheblichen Einfluss hat, konnte durch positive Färbung gegen Proteine der EZM, eine Ausbildung der EZM auch unter statischer Besiedlung nachgewiesen werden [172-174]. Durch die positive Färbung der EZM-Antigene wird davon ausgegangen, dass der Untergrund, auf dem die EC Schicht verankert ist, eine integrale Zellschicht bietet, auf dem sich die ECs gut verankern können. Eine durchgehende stabile und funktionale EC Schicht würde eine Barriere bilden, Entzündungs- und Gerinnungsvorgänge zu regulieren und somit die Notwendigkeit einer dauerhaften Antikoagulation zu umgehen [175-177].

#### **4.7 Anwendung für die Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen**

Das durchschnittliche Alter des Patientenkollektivs dieser Studie lag bei circa 60 Jahren. Im Klinikum der Universität München werden zahlreiche herzchirurgische Eingriffe getätigt, wodurch große Mengen von Zellresten anfallen. Der Grund für die Verwendung ausschließlich erwachsener Spender, war vornehmlich die Idee der Etablierung einer validen Methodik, die zukünftig auch bei kinderchirurgischen Eingriffen angewendet werden könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reduktion der Proliferationsraten der Zellen bei ansteigendem Alter gesehen. Auch Scheubel et al. beschreiben die altersabhängige Verminderung der zirkulierenden Vorläuferzellen bei Patienten, die sich einer herzchirurgischen Operation unterziehen [158]. Rousseau et al. stellen die altersabhängige und auch geschlechtsspezifische Interaktion mit der Zahl der zirkulierenden EPC dar [178]. Daher ist zu vermuten, dass die Anwendung dieser Zellquelle auch bei Neugeborenen oder Kindern im Bereich der Therapie kongenitaler Fehlbildungen seinen Platz finden könnte. Die Zellen könnten hier sogar deutlich höhere Proliferationsraten zeigen.

Bei Patienten mit kardiovaskulären Fehlbildungen, die erst postpartal festgestellt werden, ist die Nabelschnur bereits abgetrennt und periphere Gefäße eventuell nicht zugänglich. Da eine alternative Zellquelle für TE oft fehlt, könnte diese Isolationsmethodik möglicherweise dazu beitragen, die postpartal diagnostizierte angeborene Erkrankung zu heilen. Bei Patienten mit ventrikulären Anomalien ist eine Operation unabdingbar. Hier bietet die mehrstufige Norwood-Operation ein gutes Beispiel, da bei dieser im letzten operativen Schritt eine Prothese implantiert wird. Die hohe postoperative Mortalitätsrate wird in den meisten Fällen

mit der implantierten Prothese in Zusammenhang gebracht [19, 41, 73]. In Zukunft könnten also nach der ersten Operation Zellen aus dem Kardiotomiereservoir der HLM und dem Patientenblut gewonnen werden. Anschließend könnten diese Zellen kultiviert werden und dann zur Herstellung eines autologen Transplantates dienen, welches den jungen Patienten in einem zweiten Operationsschritt implantiert werden könnte. Durch die Verwendung dieser Zellen müsste dem Patienten kein zusätzliches Gewebe entnommen werden, es würde lediglich Material genutzt bzw. generiert werden, welches ansonsten entsorgt werden würde. Darüber hinaus verspricht die erfolgreiche Kryokonservierung der isolierten Zellen eine Verwendung zu einem späteren Zeitpunkt. Zusätzlich könnte die beschriebene Methodik bei multimorbiden Patienten angewandt werden. Chandra et al. beschreiben beispielsweise die erhöhte Inzidenz kardiovaskulärer Begleiterkrankungen bei Patienten mit einer Aortenklappenstenose [179]. So ist es möglich, dass sich Patienten, die einen Eingriff, wie eine Bypassoperation benötigen, im weiteren Verlauf ihres Lebens einer erneuten Therapie der Aortenklappe unterziehen müssen [180]. In diesem Fall könnten die kryokonservierten Zellen für die Kultur einer autologen Herzklappe dienen und diese dann mittels TAVI implantiert werden [56].

Die Entnahme der Reservoirs nach adulten herzchirurgischen Operationen erfolgte aufgrund von begrenzten Zugangsmöglichkeiten zu den kinderherzchirurgischen Operationen. Aufgrund ethischer Bedenken wurde sich dazu entschieden, die Etablierung der neuen Methodik durch erwachsene Spender zu untersuchen. Dennoch wird der zukünftige Einsatz der Kardiotomiereservoirs und die Gewinnung von Zellen eher im Bereich der Kinderherzchirurgie gesehen.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Nach aktuellem Wissensstand ist dies die erste Studie, die Teile der Herz-Lungen-Maschine als Zellquelle für kardiovaskuläres Tissue Engineering evaluiert. Da der Gebrauch von Stammzellen in der medizinischen Forschung heutzutage nur unter hohen rechtlichen Auflagen stattfindet, bietet diese Methode eine Alternative, an Zellen für das TE zu gelangen, die normalerweise verworfen werden würden.

Es wurden erfolgreich Fibroblasten und Endothelzellen isoliert und kultiviert, welche die Grundlage für einen fundierten Ansatz im Bereich des Tissue Engineering bilden könnten. Die in vitro Anzucht von Fibroblasten erwies sich als aussichtsreicher, als die Kultur der entnommenen Endothelzellen, die lediglich aus dem Vollblut der Patienten isoliert werden konnten. Das Kardiotomiereservoir als solches bot keine Grundlage für die Isolation von Endothelzellen. Überlegungen einer erneuten Probenentnahme aus dem Blut im postoperativen Verlauf könnte das Resultat des Endothelzellwachstums deutlich verbessern. Vereinbar mit der Literatur wurden eine höhere Proliferationsrate der Zellen bei jüngerem Alter gesehen. In der Annahme, dass die isolierten Zellen von Kindern und Neugeborenen deutlich höhere Proliferationsraten zeigen, erweist sich die Verwendung der Kardiotomiereservoirs in dieser Patientengruppe als ein vielversprechender Ansatz.

Zusätzlich sollte die Anwesenheit anderer Zelltypen in einer weiteren Arbeit genauer analysiert werden und könnte einen großen Nutzen für zukünftige Therapie darstellen. Sollte es sich bei den untersuchten Zellen tatsächlich teilweise um kardiale Vorläuferzellen handeln, würde sich dadurch ein neues Fenster im Therapieansatz öffnen.

In der Arbeit unterstreicht die kontinuierliche Zellschicht und die Entwicklung der extrazellulären Matrix auf dem synthetischen Polymer den Grundgedanken, dass die gewonnenen Zellen eines Tages für eine in vitro hergestellte Prothese dienen können. Das Ziel, eine solche Prothese sowohl als Aortenklappenersatz als auch als Therapie bei angeborenen Fehlbildungen einzusetzen, sollte weiter vorangetrieben werden. Die untersuchte Zellquelle stellt damit einen alternativen Ansatz zu den herkömmlichen Isolationsmethoden für das kardiovaskuläre Tissue Engineering dar.

## 6 Literaturverzeichnis

1. F. E. Smit, P.M.D., *Cardiovascular Tissue Engineering -- From Where We Come and Where We Are Now?* Med Sci Monit Basic Res, 2015. 21: p. 1-3.
2. Go, A.S., et al., *Heart disease and stroke statistics-2014 update*. Circulation, 2014. 129(3).
3. J. L. d'Arcy, P., J.B. Chambers, S.G. Ray, B. Bridgewater, *Valvular heart disease: the next cardiac epidemic*. Heart, 2011. 97.
4. Murray, C.J., and A. D. Lopez, *Global Burden of Disease and Injury Series, Vols. I and II, Global Health Statistics*. Boston: Harvard School of Public Health. 1996.
5. Seckeler, M.D. and T.R. Hoke, *The worldwide epidemiology of acute rheumatic fever and rheumatic heart disease*. Clin Epidemiol, 2011. 3(1): p. 67-84.
6. Yacoub, M.H. and J.J. Takkenberg, *Will heart valve tissue engineering change the world?* Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2005. 2(2): p. 60-1.
7. de Dassel, J.L., A.P. Ralph, and J.R. Carapetis, *Controlling acute rheumatic fever and rheumatic heart disease in developing countries: are we getting closer?* Curr Opin Pediatr, 2015. 27(1): p. 116-23.
8. Butcher, J.T., G.J. Mahler, and L.A. Hockaday, *Aortic valve disease and treatment: the need for naturally engineered solutions*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. 63(4-5): p. 242-68.
9. Kardiologie, V.d.D.G.f., *Deutsche Gesellschaft für Kardiologie Pocket-Leitlinien, Klappenvitien im Erwachsenenalter (pdf)*. 2007.
10. Simionescu, D.T., et al., *Form Follows Function: Advances in Trilayered Structure Replication for Aortic Heart Valve Tissue Engineering*. J Healthc Eng, 2012. 3(2): p. 179-202.
11. Grunkemeier, G.L., et al., *Long-term performance of heart valve prostheses*. Current problems in cardiology, 2000. 25(2): p. 78-154.
12. Mosby's Medical Dictionary, t.e. *Homologous graft*. (n.d.) 2009
13. *Autologous graft*. McGraw-Hill Concise Dictionary of Modern Medicine:. 2002 [Stand : 31.01.17].

14. R.J. Zdrahala, I.J.Z., *In vivo Tissue Engineering: Part 1. Concept Genesis and Guidelines for its Realization*. J Biomater Appl, 1999. Okt 1999.
15. Deutsche Herzstiftung e.V., *Deutscher Herzbericht 2017*. Frankfurt am Main, 2017.
16. Khairy, P., et al., *Changing mortality in congenital heart disease*. J Am Coll Cardiol, 2010. 56(14): p. 1149-57.
17. Hoffman, J.I. and S. Kaplan, *The incidence of congenital heart disease*. Journal of the American college of cardiology, 2002. 39(12): p. 1890-1900.
18. Schmidt, D., et al., *Living autologous heart valves engineered from human prenatally harvested progenitors*. Circulation, 2006. 114(1 suppl): p. I-125-I-131.
19. Giannico, S., et al., *Clinical outcome of 193 extracardiac Fontan patients: the first 15 years*. J Am Coll Cardiol, 2006. 47(10): p. 2065-73.
20. Conte, M.S., *The ideal small arterial substitute: a search for the Holy Grail?* The FASEB Journal, 1998.
21. Kakisis, J.D., et al., *Artificial blood vessel: the Holy Grail of peripheral vascular surgery*. J Vasc Surg, 2005. 41(2): p. 349-54.
22. Hammermeister K. , et al., *Outcomes 15 Years after valve Replacement With a Mechanical Valve Versus a Bioprosthetic Valve: Final Report of the Veterans Affairs Randomized Trial*. Journal of the American College of Cardiology, 2010. 36(4): p. 1152-8.
23. Chang, H.W., et al., *Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction undergoing primary coronary angioplasty: in vivo and in vitro studies*. Transl Res, 2010. 156(4): p. 251-63.
24. Sobrino, T., et al., *The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome*. Stroke, 2007. 38(10): p. 2759-64.
25. Ritz, U., et al., *Mobilization of CD34+-progenitor cells in patients with severe trauma*. PLoS One, 2014. 9(5): p. e97369.
26. Steffel, J. and T.F. Lüscher, *Anatomie und Physiologie des Herz-Kreislauf-Systems*, in *Herz-Kreislauf*. 2011, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-7.

27. Drenckhahn, D., *Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut: Bd. 2.* 2004: Urban & Schwarzenberg.
28. Bommas-Ebert, U., P. Teubner, and R. Voß, *Kurzlehrbuch Anatomie: und Embryologie.* 2011: Thieme.
29. Behrends, J.C., *Physiologie: 93 Tabellen.* 2010: Thieme.
30. Bauer, U. and P.E. Lange, *Angeborene Herzfehler.* Kompetenznetz Angeborene Herzfehler, Berlin, 2005.
31. M. F. Lechat, H. and Dolk, *Registries of Congenital Anomalies: EUROCAT.* Environmental Health, 1993.
32. Shinoka, T., Breuer, C, *Tissue-Engineered Blood Vessels in Pediatric Cardiac Surgery.* Yale Journal of Biology and Medicine, 2008. 81(2008): p. 161-166.
33. Samanek, M., *Children with Congenital Heart Disease- Probability of Natural Survival* 1992.
34. Neill, C.A. and E.B. Clark, *The Developing Heart: A 'History' of Pediatric Cardiology.* 1995: Springer Science & Business Media.
35. Blalock, A. and H.B. Taussig, *The surgical treatment of malformations of the heart: in which there is pulmonary stenosis or pulmonary atresia.* Journal of the American Medical Association, 1945. 128(3): p. 189-202.
36. Fortmüller, U., *Angeborene Herzfehler: Immer mehr Säuglinge überleben.* CardioVasc, 2016. 16(1): p. 23-23.
37. Ohye , R.G., et al., *Comparison of Shunt Types in the Norwood Procedure for Single-Ventricle Lesions.* New England Journal of Medicine, 2010. 362(21): p. 1980-1992.
38. Connor, J.A. and R. Thiagarajan, *Hypoplastic left heart syndrome.* Orphanet journal of rare diseases, 2007. 2(1): p. 23.
39. Azakie, A., et al., *Impact of right ventricle to pulmonary artery conduit on outcome of the modified Norwood procedure.* The Annals of thoracic surgery, 2004. 77(5): p. 1727-1733.
40. Fontan, F. and E. Baudet, *Surgical repair of tricuspid atresia fontan* Thorax, 1971. 26(3): p. 240-248.



41. Douglas D. Mair, Francisco J. Puga, Gordon K. Danielson, *The Fontan Procedure for Tricuspid Atresia: Early and Late Results of a 25-Year Experience With 216 Patients*. Journal of the American College of Cardiology, 2001. 37(3): p. 2001.
42. Francis Fontan, J.W.K., Guy Fernandez, Francisco Costa, and F.T. David C. Naftel, Eugene H. Blackstone, *Outcome After a "Perfect" Fontan Operation*. Circulation, 1990(81:1520-1536).
43. Centers for Disease Control and Prevention , *Hospital stays, hospital charges, and in-hospital deaths among infants with selected birth defects--United States, 2003*. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 2007. 56(2): p. 25.
44. Bando, K., et al., *Evolution of the Fontan procedure in a single center*. The Annals of thoracic surgery, 2000. 69(6): p. 1873-1879.
45. Unbekannt, *Rheumatic Fever and Rheumatic Heart Disease*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2004.
46. Nkomo, V.T., et al., *Burden of valvular heart diseases: a population-based study*. The Lancet, 2006. 368(9540): p. 1005-1011.
47. Statistisches Bundesamt, *Todesursachen in Deutschland*. 2014. Fachserie 12 Reihe 4.
48. Herold, G., *Innere Medizin unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges* 2016.
49. Widder, J. and J. Bauersachs, *Therapie der Aortenklappenstenose*. Der Internist, 2014. 55(12): p. 1391-1399.
50. Daniel, W.G., et al., *[Aortic stenosis]*. Clin Res Cardiol, 2006. 95(11): p. 620-41.
51. Tillmanns, N.F.B.P.D.S.C., *Pocket-Leitlinie: Diagnose und Behandlung der hypertrophen Kardiomyopathie (Version 2014)*. Eur Heart Journal, 2014. doi 10.1093/eurheartj/ehu284.
52. Bach, D.S., N. Cimino, and G.M. Deeb, *Unoperated patients with severe aortic stenosis*. Journal of the American College of Cardiology, 2007. 50(20): p. 2018-2019.
53. Stout, K.K. and C.M. Otto, *Indications for aortic valve replacement in aortic stenosis*. J Intensive Care Med, 2007. 22(1): p. 14-25.

54. Craig R. Smith, M.D., Martin B. Leon, M.D., Michael J. Mack, M.D., D. Craig Miller, M.D., Jeffrey W. Moses, M.D., et al., *Transcatheter versus Surgical Aortic-Valve Replacement in High-Risk Patients*. The New England Journal of Medicine, 2011.
55. Susheel K. Kodali, M.D., Mathew R. Williams, M.D., Craig R. Smith, M.D., et al., *Two-Year Outcomes after Transcatheter or Surgical Aortic-Valve Replacement*. The New England Journal of Medicine, 2012.
56. Kuck, K.H., et al., *Qualitätskriterien zur Durchführung der transkathetären Aortenklappenimplantation (TAVI)*. Der Kardiologe, 2014. 9(1): p. 11-26.
57. Nashef, S.A., et al., *EuroSCORE II*. Eur J Cardiothorac Surg, 2012. 41(4): p. 734-44; discussion 744-5.
58. Christen, T., R. Lerch, and P. Trindade. *Die Aortenklappenstenose beim Erwachsenen. Teil 1. Ätiologie, Pathophysiologie und Diagnose*. in *Schweizerisches Medizin-Forum*. 2006.
59. Klein, A.L., et al., *Age-related Prevalence of Valvular Regurgitation in Normal Subjects: A Comprehensive Color Flow Examination of 118, Volunteers*. Journal of the American Society of Echocardiography, 1990. 3(1): p. 54-63.
60. Nickenig, G., et al., *Konsensus der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie–Herz-und Kreislaufforschung–und der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz-und Gefäßchirurgie zur Behandlung der Mitralklappeninsuffizienz*. Der Kardiologe, 2013. 7(2): p. 76-90.
61. Werdan, K. and U. Müller, *Mitralklappenprolaps und Mitralklappenprolaps-Syndrom*. 2013: Springer-Verlag.
62. Han, Y., et al., *Cardiovascular magnetic resonance characterization of mitral valve prolapse*. JACC: Cardiovascular Imaging, 2008. 1(3): p. 294-303.
63. Buser, P., et al., *Mitralklappeninsuffizienz*, in *Kardiologie und Kardiochirurgie*. 2003, Steinkopff: Heidelberg. p. 75-78.
64. Buck, T., B. Plicht, and R. Erbel, *Aktuelle Empfehlungen zur echokardiographischen Schweregradbeurteilung der Mitralklappeninsuffizienz*. Herz, 2006. 31(1): p. 30-37.
65. Livesay, J.J., *Landmarks In Cardiac Surgery*. Texas Heart Institute Journal, 2000. 27(2): p. 222-223.

66. Matthews, A.M., *The development of the Starr-Edwards heart valve*. Texas Heart Institute Journal, 1998. 25(4): p. 282.
67. Hasan, A., et al., *Biomechanical properties of native and tissue engineered heart valve constructs*. J Biomech, 2014. 47(9): p. 1949-63.
68. Sharp, W.V., P.C. Teague, and D.L. Scott, *THROMBORESISTANCE OF PYROLYTIC CARBON GRAFTS*. ASAIO Journal, 1978. 24(1): p. 223-228.
69. Brose, S., et al., *Patientenadaptierte Klappenselektion: biologischer vs. mechanischer Herzklappenersatz bei Aortenklappenitien*. Zeitschrift für Kardiologie, 2001. 90(6): p. 48-57.
70. Pötzsch, B., *Antikoagulation*. Medizinische Klinik-Intensivmedizin und Notfallmedizin, 2013. 108(4): p. 325-336.
71. Hoffmann, G., G. Lutter, and J. Cremer, *Verbesserte Haltbarkeit von biologischen Herzklappen*. Dtsch Arztebl, 2008. 105(8): p. 143-8.
72. Vesely, I., *Heart Valve Tissue Engineering*. Circulation Research, 2005. 97(8): p. 743-755.
73. Andreas, M., et al., *The Ross procedure offers excellent survival compared with mechanical aortic valve replacement in a real-world setting*. Eur J Cardiothorac Surg, 2014. 46(3): p. 409-14.
74. El-Hamamsy, I., et al., *Long-term outcomes after autograft versus homograft aortic root replacement in adults with aortic valve disease: a randomised controlled trial*. The Lancet, 2010. 376(9740): p. 524-531.
75. Sievers, H.-H., et al., *A multicentre evaluation of the autograft procedure for young patients undergoing aortic valve replacement: update on the German Ross Registry*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2015: p. ezv001.
76. Akhyari, P., et al., *[Tissue engineering of heart valves]*. Chirurg, 2011. 82(4): p. 311-8.
77. Weber, B., et al., *Off-the-shelf human decellularized tissue-engineered heart valves in a non-human primate model*. Biomaterials, 2013. 34(30): p. 7269-80.
78. Weber, B., et al., *Tissue engineering on matrix: future of autologous tissue replacement*. Seminars in Immunopathology, 2011. 33(3): p. 307-315.

79. Hurst, J.W., W.B. Fye, and H.G. Zimmer, *The heart-lung machine was invented twice—the first time by Max von Frey. Clinical cardiology*, 2003. 26(9): p. 443-445.
80. Lam, Conrad R. "The strange story of Jay McLean, the discoverer of heparin." *Henry Ford Hospital Medical Journal* 33.1 (1985): 18-23.
81. Gibbon, J.H., *Development of the artificial heart and lung extracorporeal blood circuit. Jama*, 1968. 206(9): p. 1983-1986.
82. Zenker, R. and G. Heberer, *Herzoperationen mit Hilfe einer Herz-Lungen-Maschine. Langenbecks Archiv für klinische Chirurgie*, 1959. 292(1): p. 359-371.
83. Schmid, C. and A. Philipp, *Herz-Lungen-Maschine*, in *Leitfaden extrakorporale Zirkulation*. 2011, Springer. p. 41-71.
84. Philipp, A., et al., *Langzeitfunktion von Oxygenatoren bei extra korporaler Lungenunterstützung. Kardiotechnik*, 2009.
85. Cosgrove, D.M. and J.F. Sabik, *Minimally invasive approach for aortic valve operations. The Annals of thoracic surgery*, 1996. 62(2): p. 596-597.
86. Übersetzung aus : McIntire, L.V., *World Technology Panel Report on Tissue Engineering. Annals of Biomedical Engineering*, 2002. 30(10): p. 1216-1220 // Citation on Page 1217.
87. Haverich, A., *[Tissue engineering in cardiac surgery]. Chirurg*, 2011. 82(4): p. 293-4.
88. Hirt, M.N., A. Hansen, and T. Eschenhagen, *Cardiac Tissue Engineering. Circulation research*, 2014. 114(2): p. 354-367.
89. Gest, H., *The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. Notes and Records of the Royal Society*, 2004. 58(2): p. 187-201.
90. Schwann, T., *Mikroskopische Untersuchungen über die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen: mit 4 Kupfertafeln*. 1839: Reimer.
91. Doerr, W., *Die Pathologie Rudolf Virchows und die Medizin unserer Zeit1. DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 1958. 83(10): p. 370-377.
92. Carrel, A., *Artificial activation of the growth in vitro of connective tissue. The Journal of experimental medicine*, 1913. 17(1): p. 14-19.

93. Berthiaume, F., T.J. Maguire, and M.L. Yarmush, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges*. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2011. 2(1): p. 403-430.
94. Langer, R. and J. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. 260(5110): p. 920-926.
95. Gordijn, B., *Medizinische Utopien: eine ethische Betrachtung*. 2004, Vandenhoeck & Ruprecht.
96. Vacanti, C.A. and J.P. Vacanti, *The science of tissue engineering*. Orthopedic Clinics of North America, 2000. 31(3): p. 351-355.
97. Wintermantel, E., et al., *Biokompatibilität*, in *Medizintechnik Life Science Engineering*. 2008, Springer. p. 59-96.
98. Ruffieux, K. and E. Wintermantel, *Degradable Implantate: Entwicklungsbeispiele*, in *Medizintechnik*. 2009, Springer. p. 1585-1599.
99. Thierfelder, N., et al., *In vitro comparison of novel polyurethane aortic valves and homografts after seeding and conditioning*. ASAIO J, 2013. 59(3): p. 309-16.
100. Sodian, R., *Tissue engineering von kardiovaskulären Geweben*. 2005.
101. *Bildquelle*: Wasylyk, R. *A valve for saving your heart*; [Online im Internet:] <http://glimpse.clemson.edu/2366/> [Stand : 13.03.2017].
102. *Bildquelle*: Campolo, M., F. Curcio, and A. Soldati, *Minimal perfusion flow for osteogenic growth of mesenchymal stem cells on lattice scaffolds*. AIChE Journal, 2013. 59(8): p. 3131-3144.
103. *Bildquelle*: Hollister, S.J., *Porous scaffold design for tissue engineering*. Nature Materials, 2005. 4: p. 518.
104. *Bildquelle*: Ballwieser, D. *Herzklappen- Ersatz durch die Leiste*. 2012, [Online im Internet: <https://www.spiegel.de/gesundheit/diagnose/herzklappen-operation-mittels-katheter-durch-ueber-die-leiste-a-854346.html>] [Stand : 13.03.2017].
105. Bonner-Weir, S., *Stem Cells in Diabetes: What Has Been Achieved*. Hormone Research, 2003. 60(Suppl. 3): p. 10-10.

106. Schwanke, K., et al., *Generation and characterization of functional cardiomyocytes from rhesus monkey embryonic stem cells*. Stem Cells, 2006. 24(6): p. 1423-32.
107. Nicole I. zur Nieden, G.K.H.J.A., *In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts*. Differentiation, 2003.
108. Leor, J. and S. Cohen, *Myocardial Tissue Engineering: Creating a Muscle Patch for a Wounded Heart*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2004. 1015(1): p. 312-319.
109. Kofidis, T., et al., *Myocardial restoration with embryonic stem cell bioartificial tissue transplantation*. The Journal of heart and lung transplantation, 2005. 24(6): p. 737-744.
110. Kehat, I., et al., *Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes*. The Journal of clinical investigation, 2001. 108(3): p. 407-414.
111. Nussbaum, J., et al., *Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response*. The FASEB Journal, 2007. 21(7): p. 1345-1357.
112. Robertson, J. A. (2001). *Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues*. Nature Reviews Genetics, 2(1), 74-78.
113. Centeno, C., et al., *Safety and Complications Reporting on the Re-implantation of Culture-Expanded Mesenchymal Stem Cells using Autologous Platelet Lysate Technique*. Current Stem Cell Research & Therapy, 2010.
114. Hilfiker, A., et al., *Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation?* Langenbecks Arch Surg, 2011. 396(4): p. 489-97.
115. Yamaoka, E., et al., *Neoplastic transformation by TERT in FGF-2-expanded human mesenchymal stem cells*. Int J Oncol, 2011. 39(1): p. 5-11.
116. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. 126(4): p. 663-76.
117. Nieminen, O., *Tissue engineering: viable technologies seeking regulation ? a Finnish perspective*. Drug Discovery Today, 2004. 9(9): p. 387-391.

118. Sodian, R., et al., *Tissue engineering of autologous human heart valves using cryopreserved vascular umbilical cord cells*. Ann Thorac Surg, 2006. 81(6): p. 2207-16.
119. Schmidt, D., et al., *Prenatally fabricated autologous human living heart valves based on amniotic fluid derived progenitor cells as single cell source*. Circulation, 2007. 116(11 Suppl): p. I64-70.
120. Steinhoff, G., *The regenerating heart--hope for children with congenital heart defects*. Kinderkrankenschwester: Organ der Sektion Kinderkrankenpflege/Deutsche Gesellschaft für Sozialpädiatrie und Deutsche Gesellschaft für Kinderheilkunde, 2006. 25(2): p. 47.
121. Reimann, V., U. Creutzig, and G. Kögler, *Stammzellen aus Nabelschnurblut in der Transplantations-und regenerativen Medizin*. Dtsch Arztl Int, 2009. 106(50): p. 831-6.
122. Hoerstrup S., et al., *Tissue Engineering of Functional Trileaflet Heart Valves from Human Marrow Stromal Cells*. Circulation, 2002. 106(I-143-I-150).
123. Perry, T.E., et al., *Bone marrow as a cell source for tissue engineering heart valves*. The Annals of thoracic surgery, 2003. 75(3): p. 761-767.
124. Yerebakan, C., et al., *Safety of intramyocardial stem cell therapy for the ischemic myocardium: results of the Rostock trial after 5-year follow-up*. Cell transplantation, 2007. 16(9): p. 935-940.
125. Lengner, C.J., *iPS cell technology in regenerative medicine*. Ann N Y Acad Sci, 2010. 1192: p. 38-44.
126. Nakagawa, M., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. Nature biotechnology, 2008. 26(1): p. 101-106.
127. Klopsch, C., et al., *[Cell sources for cardiovascular tissue engineering]*. Chirurg, 2011. 82(4): p. 295-302.
128. Schaefermeier, P.K., et al., *Potential cell sources for tissue engineering of heart valves in comparison with human pulmonary valve cells*. ASAIO J, 2009. 55(1): p. 86-92.
129. Shinoka, T., et al., *Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model*. The Annals of thoracic surgery, 1995. 60: p. S513-S516.

130. Sodian, R., et al., *Tissue engineering of heart valves: in vitro experiences*. The Annals of thoracic surgery, 2000. 70(1): p. 140-144.
131. Schnell, A., et al., *Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts*. The Thoracic and cardiovascular surgeon, 2001. 49(04): p. 221-225.
132. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science, 1997, 275(5302), 964-966.
133. Roberts, N., et al., *Endothelial progenitor cells are mobilized after cardiac surgery*. Ann Thorac Surg, 2007. 83(2): p. 598-605.
134. Hill, J.M., et al., *Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk*. New England Journal of Medicine, 2003. 348(7): p. 593-600.
135. Gravlee, G.P., et al., *Cardiopulmonary Bypass and Mechanical Support: Principles and Practice*. 2015: Wolters Kluwer Health.
136. Spektrum Lexikon der Biologie; optische Dichte; 1998 ; [Online im Internet:] <http://www.spektrum.de/lexikon/physik/optische-dichte/1068> [Stand: 20.01.2017]
137. Tousimis, A.J., *Critical point drying systems and methods for in situ tissue preservation*. 2015, Google Patents.
138. v Ardenne, M., *Das Elektronen-Rastermikroskop, Theoretische Grundlagen*. Z. Physik, 1938. 109(9. u. 10): p. 553-572.
139. Chalmers, J., et al., *Validation of EuroSCORE II in a modern cohort of patients undergoing cardiac surgery*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2013. 43(4): p. 688-694.
140. Stark, J., *The Use of Valved Conduits in Pediatric Cardiac Surgery*. Pediatric Cardiology, 1998. 19(4): p. 282-288.
141. Karamlou, T., et al., *Outcomes and Associated Risk Factors for Aortic Valve Replacement in 160 Children. A Competing-Risks Analysis*, 2005. 112(22): p. 3462-3469.
142. Bermudez, C.A., et al., *Late results of the peel operation for replacement of failing extracardiac conduits*. The Annals of thoracic surgery, 2004. 77(3): p. 881-888.
143. Gao, Y. and J.G. Jacot, *Stem Cells and Progenitor Cells for Tissue-Engineered Solutions to Congenital Heart Defects*. Biomark Insights, 2015. 10(Suppl 1): p. 139-46.



144. Jana, S., R.T. Tranquillo, and A. Lerman, *Cells for tissue engineering of cardiac valves*. J Tissue Eng Regen Med, 2015.
145. Deutsche Gesellschaft für Thorax, H.-u.G. *Gesamtzahl der herzchirurgischen Eingriffe auf stabilem Niveau*. 2016 [Stand : 24.01.17].
146. Klinikum Universität Heidelberg, *Operationszahlen 2019*; [Online im Internet:] <https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/chirurgische-klinik-zentrum/herzchirurgie/ueber-uns/operationszahlen> [Stand : 27.01.17]
147. Fleck, P.D.E., *Deutscher Herzbericht 2015 Viele Herz-Patienten leben immer länger – kardiologische Versorgung auf hervorragendem Niveau*. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie –Herz und Kreislaufforschung e.V. (DGK), 2016.
148. Nicolini, F., et al., *Comparison between off-and on-pump coronary artery bypass grafting: long-term results of a real-world registry*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2016: p. ezw128.
149. Misfeld, M., et al., *Neurologic complications after off-pump coronary artery bypass grafting with and without aortic manipulation: meta-analysis of 11,398 cases from 8 studies*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2011. 142(2): p. e11-e17.
150. Puis, L.; EACTS/EACTA/EBCP Committee Reviewers, *2019 EACTS/EACTA/EBCP guidelines on cardiopulmonary bypass in adult cardiac surgery*, Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery, Volume 30, Issue 2, February 2020, Pages 161–202
151. Huang, H., Hsing, H., Lai, T. et al. *Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells*. J Biomed Sci 17, 36 (2010)
152. Dotsenko, O., et al., *Bone marrow resident and circulating progenitor cells in patients undergoing cardiac surgery*. Ann Thorac Surg, 2010. 90(6): p. 1944-51.
153. Ruel, M., et al., *Effects of off-pump versus on-pump coronary artery bypass grafting on function and viability of circulating endothelial progenitor cells*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005. 130(3): p. 633-9.

154. Regueiro, A., et al., *Mobilization of endothelial progenitor cells in acute cardiovascular events in the PROCELL study: time-course after acute myocardial infarction and stroke.* J Mol Cell Cardiol, 2015. 80: p. 146-55.
155. Hoesli, S.J., et al., *Endothelial colony-forming cells and mesenchymal stem cells from ECMO circuits of term infants.* J Perinatol, 2010. 30(11): p. 724-30.
156. Cebotari, S., et al., *Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells.* Circulation, 2006. 114(1 suppl): p. I-132-I-137.
157. Kort, E.J., et al., *Circulating Progenitor Cells and Childhood Cardiovascular Disease.* Pediatric Cardiology, 2016. 37(2): p. 225-231.
158. Scheubel, R.J., et al., *Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells inpatients undergoing coronary artery bypass grafting.* Journal of the American College of Cardiology, 2003. 42(12): p. 2073-2080.
159. Hewett, P.W. and J.C. Murray, *Human microvessel endothelial cells: Isolation, culture and characterization.* In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 1993. 29(11): p. 823-830.
160. Hewett, P.W., *Isolation and Culture of Human Endothelial Cells from Micro- and Macro-vessels,* in *Angiogenesis Protocols*, S.G. Martin and P.W. Hewett, Editors. 2016, Springer New York: New York, NY. p. 61-76.
161. Fedarko, N. S., et al., *Cell proliferation of human fibroblasts and osteoblasts in osteogenesis imperfecta: influence of age,* 1995. Journal of bone and mineral research, 10(11), 1705-1712.
162. Gstraunthaler, Gerhard, and Toni Lindl. "Zell-und Gewebekultur." *Zell-und Gewebekultur* 10 (2013): Seite 178
163. Davis, D.R., et al., *Isolation and expansion of functionally-competent cardiac progenitor cells directly from heart biopsies.* Journal of molecular and cellular cardiology, 2010. 49(2): p. 312-321.
164. Smith, R.R., et al., *Electrophysiology of human and porcine adult cardiac stem cells isolated from endomyocardial biopsies.* Circulation, 2005. 111(13): p. 1720.

165. Doppler, S.A., et al., *Cardiac regeneration: current therapies-future concepts*. J Thorac Dis, 2013. 5(5): p. 683-97.
166. Tan, J.-J., et al., *Isolation and Expansion of Cardiosphere-Derived Stem Cells*. 2011.
167. Emmert, M.Y., R.W. Hitchcock, and S.P. Hoerstrup, *Cell therapy, 3D culture systems and tissue engineering for cardiac regeneration*. Adv Drug Deliv Rev, 2014. 69-70: p. 254-69.
168. Aleksieva, Genoveva, et al. *Use of a special bioreactor for the cultivation of a new flexible polyurethane scaffold for aortic valve tissue engineering*. Biomedical engineering online 11.1 (2012): 92.
169. Laschke, M., et al., *In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering*. Acta biomaterialia, 2009. 5(6): p. 1991-2001.
170. Mackay, T., et al., *New polyurethane heart valve prosthesis: design, manufacture and evaluation*. Biomaterials, 1996. 17(19): p. 1857-1863.
171. Kidane, A.G., et al., *Current developments and future prospects for heart valve replacement therapy*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2009. 88B(1): p. 290-303.
172. Jockenhoevel, S., et al., *Cardiovascular tissue engineering: a new laminar flow chamber for in vitro improvement of mechanical tissue properties*. ASAIO journal, 2002. 48(1): p. 8-11.
173. Mol, A., et al., *Tissue engineering of human heart valve leaflets: a novel bioreactor for a strain-based conditioning approach*. Annals of biomedical engineering, 2005. 33(12): p. 1778-1788.
174. Mohd Ali, N., et al., *Probable impact of age and hypoxia on proliferation and microRNA expression profile of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells*. PeerJ, 2016. 4: p. e1536.
175. Brown, R.D., et al., *The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. 45: p. 657-87.
176. Jonathan T. Butcher, R.M.N., *Valvular endothelial cells and the mechanoregulation of valvular pathology*. Phil. Trans. R. Soc. B, 2007. 362: p. 1445–1457.

177. Sumpio, B.E., J.T. Riley, and A. Dardik, *Cells in focus: endothelial cell*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2002. 34(12): p. 1508-1512.
178. Rousseau, A., et al., *Impact of age and gender interaction on circulating endothelial progenitor cells in healthy subjects*. Fertility and sterility, 2010. 93(3): p. 843-846.
179. Chandra, H.R., et al., *Adverse outcome in aortic sclerosis is associated with coronary artery disease and inflammation*. Journal of the American College of Cardiology, 2004. 43(2): p. 169-175.
180. Otto, C.M., et al., *Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly*. New England Journal of Medicine, 1999. 341(3): p. 142-147.

## 7 Anhang

### 7.1 Geräte- und Materialliste

#### 7.1.1 Geräte und Ausrüstung

Artikel	Hersteller
<b>6-Kant-Schraubendreher</b>	Hoffmann GmbH, München, GER
<b>Analysenwaage ABS 770</b>	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, GER
<b>AxioObserver</b>	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, GER
<b>Becherglas mit Auslassventil</b>	
<b>Computer Fujitsu</b>	Siemens
<b>Critical PointDryer „CPD30 “</b>	BalTec, Schalksmühle, Germany
<b>Feuchte Kammer</b>	Laborwerkstatt Klinikum Großhadern, München, GER
<b>Fluoreszenzlampe HXP120</b>	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, GER
<b>Gefrierschrank, -20°C „Comfort Plus “</b>	Siemens, München, GER
<b>Gefrierschrank, -80°C</b>	Kendro Laboratory Products, Hanau, GER
<b>Inkubator APT line TM CB</b>	Binder GmbH, Tuttlingen, GER
<b>Inkubator, Hera Cell</b>	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, GER
<b>Kardiotomierservoir</b>	Sorin Inspire™ HVR Dual; Sorin Group Deutschland GmbH, München, GER
<b>Kühlschrank „Glass Line “</b>	Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, GER
<b>Laminar Airflow “Hera Safe”</b>	Kendro Laboratory Products, Hanau, GER
<b>Lichtmikroskop „Axiovert 35 “</b>	Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Göttingen, GER
<b>Multiskan ® EX</b>	Thermo Electro Corporation, Vantaa, FIN
<b>Nalge Nunc Cryo 1°C Freezing container</b>	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DNK
<b>Pipetboy</b>	Eppendorf, Eppendorf AG, Hamburg, GER

<b>Pipette 0,1-3µl</b>	Biohit, Sartorius Lab Instruments GmbH, Göttingen, GER
<b>Pipette 100-1000µl</b>	Biohit, Sartorius Lab Instruments GmbH, Göttingen, GER
<b>Pipette 100-200µl</b>	Biohit, Sartorius Lab Instruments GmbH, Göttingen, GER
<b>Power Supply</b>	Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, GER
<b>REM Evo LS 10</b>	Zeiss Micro Imaging GmbH, Jena, GER
<b>REM-Pinzette</b>	Baltic Präparation, Koppelheck, GER
<b>Sputter Coater SCD50</b>	BalTec, Schalksmühle, GER
<b>Thermorüttler</b>	
<b>Vortex-Mixer; MS1 Mini shaker</b>	IKA Works, Staufen, GER
<b>Wasserbad „Julabo SW23 “</b>	Kendro Laboratory Products, Hanau, GER
<b>Zentrifuge „Rotina 46R “</b>	Hettich, Tuttlingen, GER

#### 7.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestell-Nr</b>
<b>12-Well Platten</b>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER	353043
<b>24 x 24 mm Deckgläser</b>	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, GER	H 875.1
<b>24-Well-Platten</b>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER	353047
<b>96-Well-Platten</b>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER	677180
<b>Abdecktuch Secu-Drape, steril, 45 x 75 cm</b>	Sengewald, Clinic Innovations, Rohrdorf- Thansau, GER	504572
<b>Becher mit Deckel, steril 500 ml</b>	Klinikum Grosshadern, München, GER	
<b>Becher, unsteril 500 ml</b>	Klinikum Grosshadern, München, GER	
<b>Bull-Dog-Klemme</b>	Klinikum Grosshadern, München, GER	
<b>Chirurgischer Nähfaden, Supolene grün</b>	Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, GER	91513
<b>Cryo Tubes</b>	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, GER	375418

<b>Dreiwegehähne Discofix C</b>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER	1694 C
<b>Dreiwegehähne mit Schlauch Discofix C</b>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER	16500 C
<b>Fermacidal D2</b>	IC Products SA, Minusio, CH	CHZB0445
<b>Glas-Objektträger-Kammern, steril</b>	Falcon, Corning Inc., Corning, USA	FALC354108
<b>Handschuhe, steril</b>	Semperit GmbH, Wien, AUT	822751805
<b>High-Vacuum Grease Silicone Dow Corning®</b>	Dow Corning Corporation, Midland MI, USA	Z273554-1EA
<b>Klemme, steril</b>	Klinikum Grosshadern, München, GER	
<b>Knopfkanüle</b>	Medtronic GmbH, Meerbusch, GER	30004
<b>Kunststoffscheiben, doppelseitig klebend</b>		
<b>Millex-GS Spritzenfilter 0,2 µm, steril</b>	Millipore Corporation, MA, USA	SLGS033SS
<b>Neolus Luer Needles</b>	Terumo Europe N.V., Leuven, BEL	NN-2070S
<b>Nierenschale, steril</b>	Klinikum Grosshadern, München, GER	
<b>Objektträger Superfrost®</b>	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel, Braunschweig, GER	631-1304
<b>Petrischale (92 x 16 mm)</b>	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, GER	82.1473.001
<b>Petrischalen aus Polystyren Ø10 cm</b>	Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, GER	4021
<b>Pipettenspitzen 10 µl</b>	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, GER	70.1116.210
<b>Pipettenspitzen 100 µl</b>	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, GER	70.760.212
<b>Pipettenspitzen 1250 µl</b>	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, GER	70.1186.210
<b>Polyurethan Patch, steril</b>	ITV Denkendorf, Denkendorf, GER	SB 0663-01
<b>Reaktionsgefäß 1,5ml</b>	Eppendorf AG, Hamburg, GER	0030 120.086
<b>Schere, steril</b>	Klinikum Grosshadern, München, GER	
<b>Skalpell Nr. 20</b>	Feather Safety RazorCo., LTD. Medical Division, JPN	02.001.30.020

<b>Spritze, 2 ml</b>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER	300928
<b>Spritze, 20 ml</b>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER	300296
<b>Stickstoffbehälter</b>	Messer Griesheim	
<b>Zählkammer C-Chip</b>	NanoEnTek Inc., Seoul, KOR	DHC-N01
<b>Zellkulturflasche 12,5 cm<sup>2</sup></b>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GER	
<b>Zellkulturflasche 175 cm<sup>2</sup></b>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER	83.1812.002
<b>Zellkulturflasche 75 cm<sup>2</sup></b>	Corning Incorporated, Corning USA	430641U
<b>Zentrifugenröhrchen (15ml)</b>	Falcon, Corning Inc., Corning, USA	FALC352196
<b>Zentrifugenröhrchen (50ml)</b>	Falcon, Corning Inc., Corning, USA	FALC352070

### 7.1.3 Reagenzien

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestell-Nr</b>
<b>Aceton</b>	Merck Millipore KGaA, Darmstadt, GER	1.00014.5000
<b>AEC Substrate Kit</b>	Vector Laboratories INC, California, USA	SK 4200
<b>Ampuwa</b>	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d. H., GER	B230673
<b>Anti-Laminin antibody produced in rabbit</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	L9393
<b>Anti-von Willebrand Factor antibody produced in rabbit</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	F3520
<b>Antibody Diluent</b>	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, GER	S080983-2
<b>Biocoll Separating Solution 1.077g/ml</b>	Biochrom AG, Berlin, GER	L 6113
<b>Bovine Serum Albumin (BSA)</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	A 7906
<b>Cytoscan HRP Detection System</b>	Cell Marque	951D-30
<b>Dako Antibody Diluent</b>	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, GER	S0809



<b>DAPI dilactate</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	D9564
<b>Dimethyl sulfoxide (DMSO)</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	D2650
<b>Donkey anti-mouse IgG Alexa Fluor® 555</b>	Abcam plc, Cambridge, UK	AB150110
<b>EDTA</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	E-4884
<b>Endothelial Cell Growth Medium Supplement Pack</b>	Promocell GmbH, Heidelberg, GER	C39210
<b>Endothelial Cell Growth Medium</b>	Promocell GmbH, Heidelberg, GER	C22010
<b>Ethanol 30%; 50%; 70%</b>	Apotheke, Klinikum Grosshadern, München, GER	
<b>Ethanol 96%</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	1.08543
<b>Ethanol 99,9%, unvergällt</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	34963
<b>Fetal Calf Serum</b>	Lonza Group Ltd., Basel, CH	14-801F
<b>Fibroblast Growth Medium</b>	Promocell GmbH, Heidelberg, GER	C23010
<b>Fibroblast Growth Medium Supplement Pack</b>	Promocell GmbH, Heidelberg, GER	C23110
<b>Gefriereinbettmedium Shandon™ Cryomatrix™</b>	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DNK	6769006
<b>Gentamycin 10mg/ml</b>	Biochrom AG, Berlin, GER	A2712
<b>Glutaraldehyd-Lösung, Grad 1 (25%)</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	G5882
<b>Goat anti-rabbit IgG AF 647</b>	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DNK	A-21245
<b>H2O2 30%</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	21676-3
<b>Heparin, 25000 IE/ 5 ml</b>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER	126/317126/040 3
<b>HRP Detection System</b>	Medac GmbH, Hamburg, GER	951D-30
<b>Kollagenase Typ 2, CLS-2 (253 u/ mg)</b>	Worthington Biochemical Corporation/ CellSystems GmbH, St. Katharinen, GER	4174, CHB:41K12925

<b>Mayers Hämalanlösung</b>	Merck Millipore KGaA, Darmstadt, GER	1.09249.0500
<b>Medium 199 Earle' s</b>	Biochrom AG, Berlin, GER	
<b>MetOH</b>	Merck Millipore KGaA, Darmstadt, GER	1.06009.2500
<b>Monoclonal Anti-Elastin antibody produced in mouse</b>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER	E4013
<b>Monoclonal Anti-Fibronectin antibody produced in mouse</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	F0791
<b>Monoclonal Mouse Anti Collagen Type IV</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	C1926
<b>Monoclonal Mouse Anti Human TE-7 Fibroblast</b>	Merck Millipore KGaA, Darmstadt, GER	CBL 271
<b>Monoclonal Mouse Anti Human VE-Cadherin</b>	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, GER	IM1579
<b>Monoclonal Mouse Anti-Human CD31 Endothelial Cell</b>	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, GER	M0823
<b>Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Myosin Heavy Chain</b>	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, GER	M3558
<b>Natrium cacodylat trihydrat - Lösung</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	C4945
<b>Natriumcitrat</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	S4641
<b>Penicillin Streptomycin Solution Stabilized</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	P4458
<b>Phosphate Buffered Saline (PBS)</b>	Biochrom AG, Berlin, GER	L 1825
<b>PI</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	81845
<b>Proteinase</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	P8038
<b>Salzsäure 0.1 mol/l (0.1 N) 0,1N Titrisol ®</b>	Merck Millipore KGaA, Darmstadt, GER	109973

<b>SiR Actin Kit + Verapamil</b>	Spirochrome AG, Stein am Rhein, CH	SC001
<b>Syto9</b>	Life Technologies GmbH, Darmstadt, GER	S-34854
<b>Triton X- 100</b>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER	3051.3
<b>Trypanblau Sol.0,4 %</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	T8154
<b>Trypsin-EDTA 10x Solution</b>	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER	T:4174
<b>Wässriges Eindeckmedium</b>	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, GER	S1964
<b>WST-1</b>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, GER	05015944001

## 7.2 Unbedenklichkeitsbescheinigung

			
<p>Ethikkommission Pettenkoferstr. 8 - 80336 München</p>			
<p>Herrn Dr. Nikolaus Thierfelder Labor für Tissue Engineering Herzchirurgische Klinik u. Poliklinik Klinikum der Universität München Marchioninistr.15 81377 München</p>		<p>Vorsitzender: Prof. Dr. W. Eisenmenger Telefon+49 (0)89 440055191 Telefax+49 (0)89 440055192 Ethikkommission@ med.uni-muenchen.de  <a href="http://www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de">www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de</a>  Postanschrift: Pettenkoferstr. 8a D-80336 München  Hausanschrift: Pettenkoferstr. 8 D-80336 München  20.10.2014 Hb / ck</p>	

Betreff:	Evaluation von Kardiotomieblut als alternative Zellquelle für kardiovaskuläres Tissue Engineering
Antragsteller:	Dr. Nikolaus Thierfelder
UE Nr	124-14

Sehr geehrter Herr Dr. Thierfelder,

haben Sie besten Dank für Ihr Schreiben (E-mail) vom 20.10.2014, mit dem Sie uns um eine Unbedenklichkeitsbescheinigung für das o. g. Projekt bitten.

Sofern Sie Ihre Untersuchung anhand von aus Blut gewonnenem Zellmaterial durchführen, das irreversibel anonymisiert ist, d. h. dass auch die Bearbeiter keinen Rückschluss auf die Daten der entsprechenden Personen erhalten, bestehen keine ethisch-rechtlichen Bedenken gegen dieses Projekt.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung Ihres Vorhabens die Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Für Ihre Untersuchungen wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

  
Prof. Dr. W. Eisenmenger  
Vorsitzender der Ethikkommission

Mitglieder der Kommission:  
Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender) Prof. Dr. C. Bausewein, PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. B. Emmerich, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Dr. B. Henrikus, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. D. Nowak, Prof. Dr. H. H. Müller, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. Ch. Zach



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

ETHIKKOMMISSION BEI DER LMU MÜNCHEN



Ethikkommission · Pettenkoferstr. 8 · 80336 München

Dr. Nikolaus Thierfelder  
Herzchirurgische Klinik und Poliklinik  
Klinikum der Universität München  
Marchioninistr. 15  
81377 München

Vorsitzender:  
Prof. Dr. W. Eisenmenger  
Telefon+49 (0)89 440055191  
Telefax+49 (0)89 440055192  
Ethikkommission@  
med.uni-muenchen.de  
[www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de](http://www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de)

Anschrift:  
Pettenkoferstr. 8a  
D-80336 München

27.04.2015 Hb/ck

Unser Zeichen: 259-15 (bitte bei Schriftwechsel angeben)

#### Antrag auf Unbedenklichkeitserklärung

**Titel:** Evaluation des Einsatzes von arteriellen und venösen Gefäßwandzellen im kardiovaskulären Tissue Engineering  
**Antragsteller:** Dr. Nikolaus Thierfelder, Herzchirurgische Klinik und Poliklinik, Klinikum der Universität München, Marchioninistr. 15, 81377 München

Sehr geehrter Herr Dr. Thierfelder,


besten Dank für Ihr Schreiben (E-Mail) vom 27.04.2015, mit dem Sie um eine Unbedenklichkeitserklärung für das o.g. Projekt bitten.

Sofern Sie Ihre Untersuchungen nur retrospektiv anhand von Gefäßstücken und daraus isoliertem/verwendetem Zellmaterial durchführen, welche/s irreversibel anonymisiert sind/ist, d. h. dass auch die Bearbeiter keinen Rückschluss auf die personenbezogenen Daten der Probanden erhalten, bestehen keine ethisch- rechtlichen Bedenken gegen dieses Projekt.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung Ihres Vorhabens die ärztliche und juristische Verantwortung für die Verantwortung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

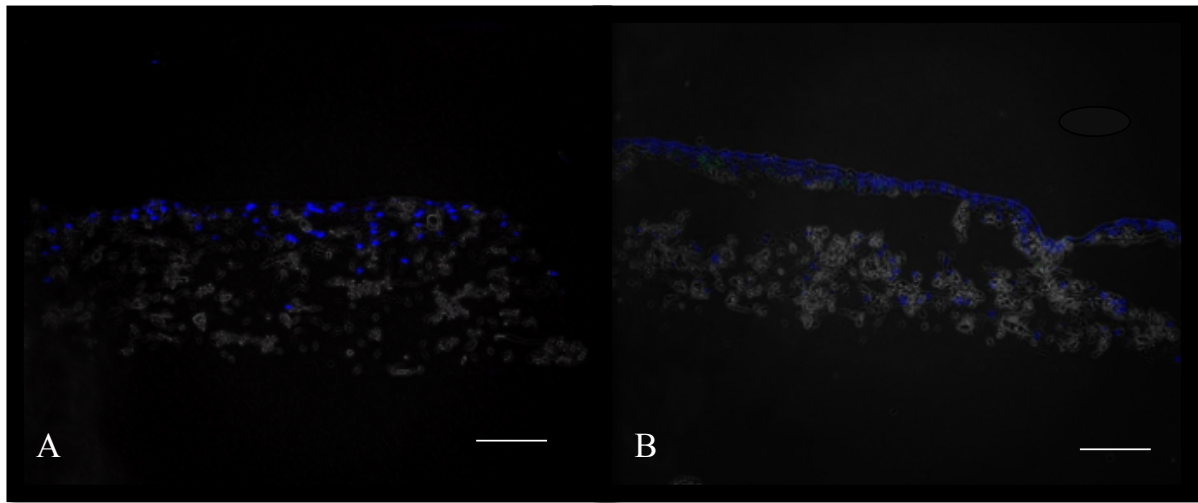
Für Ihre Untersuchungen wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mit freundlichen Grüßen

  
Prof. Dr. W. Eisenmenger  
Vorsitzender der Ethikkommission

Mitglieder der Kommission:  
Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. C. Bausewein, PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. B. Emmerich, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Dr. B. Henrikus, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. D. Nowak, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Hahn, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. A. Yassouridis, Dr. Ch. Zach

### 7.3 Immunfluoreszenz



**Abbildung 1: Negativproben der sekundären Antikörper: (A) Donkey anti-mouse IgG und Visualisierung der Zellkerne mit DAPI (blau) ; (B) Goat anti-rabbit IgG AF 647 und Visualisierung der Zellkerne mit DAPI (blau); Es zeigt sich keine Fluoreszenz bei vorheriger alleiniger Inkubation mit den sekundären Antikörpern; Maßstab (A+B) : 100µm**

## 7.4 Nachweis der Extrazellulären Matrix

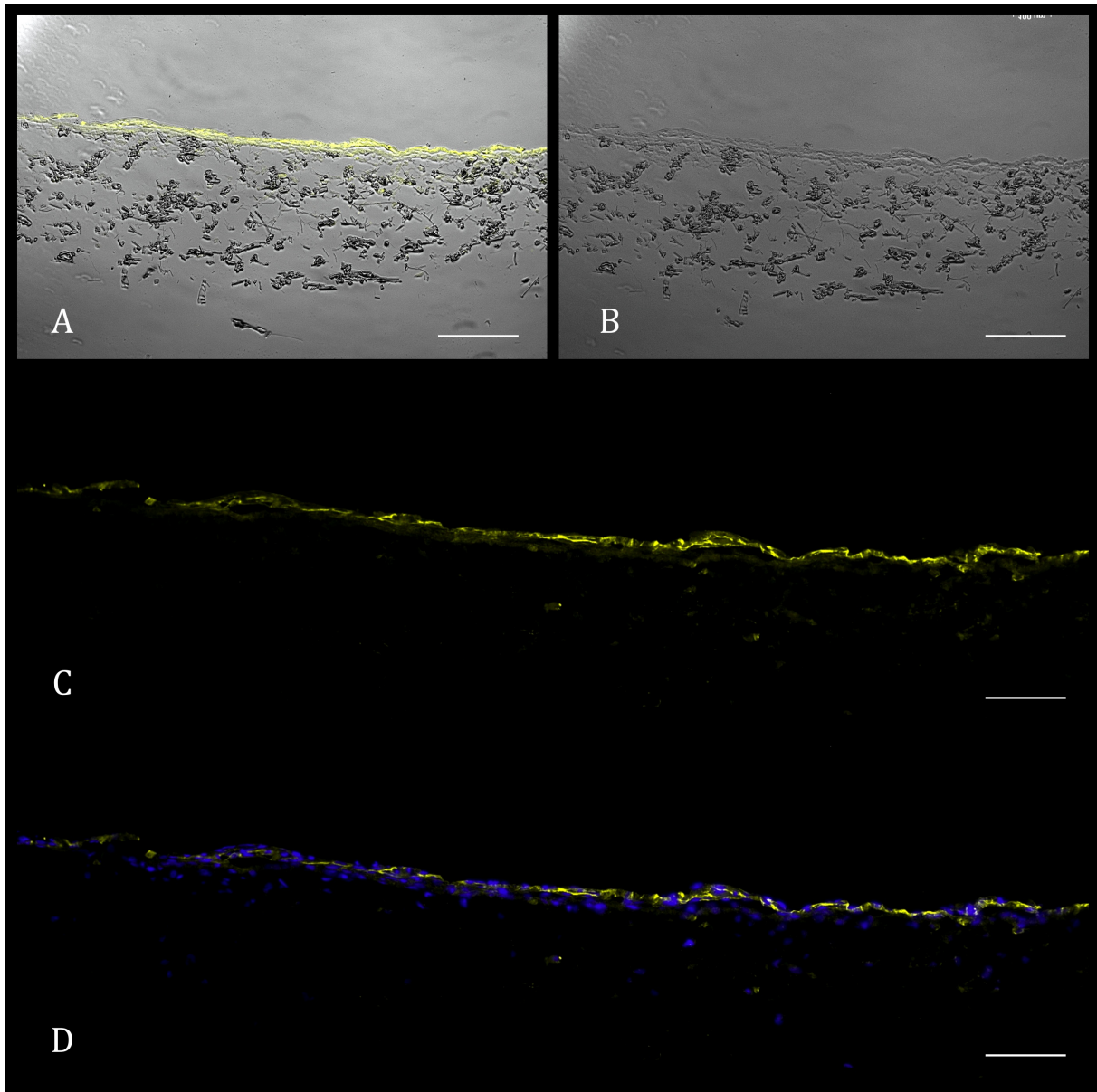
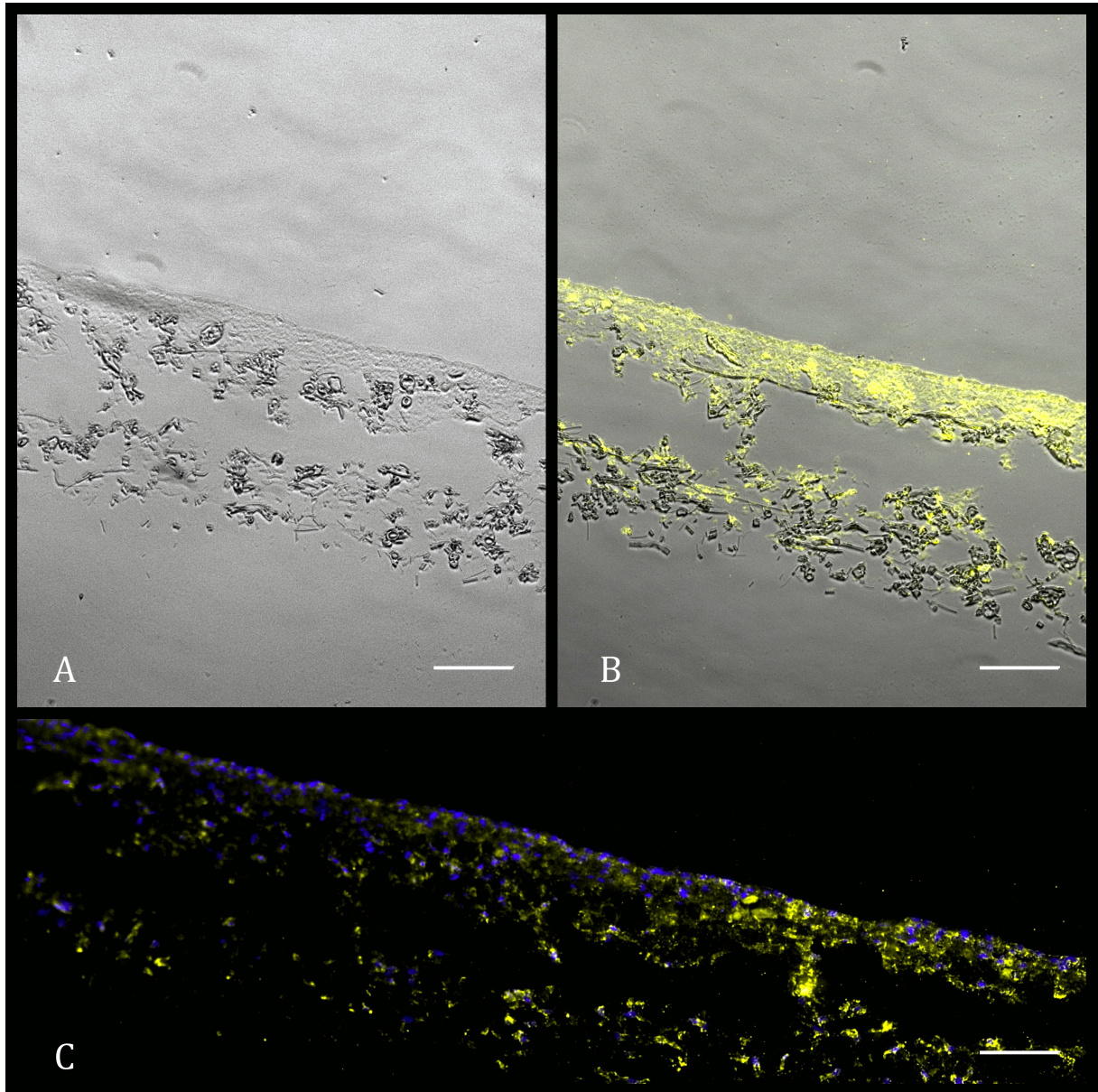


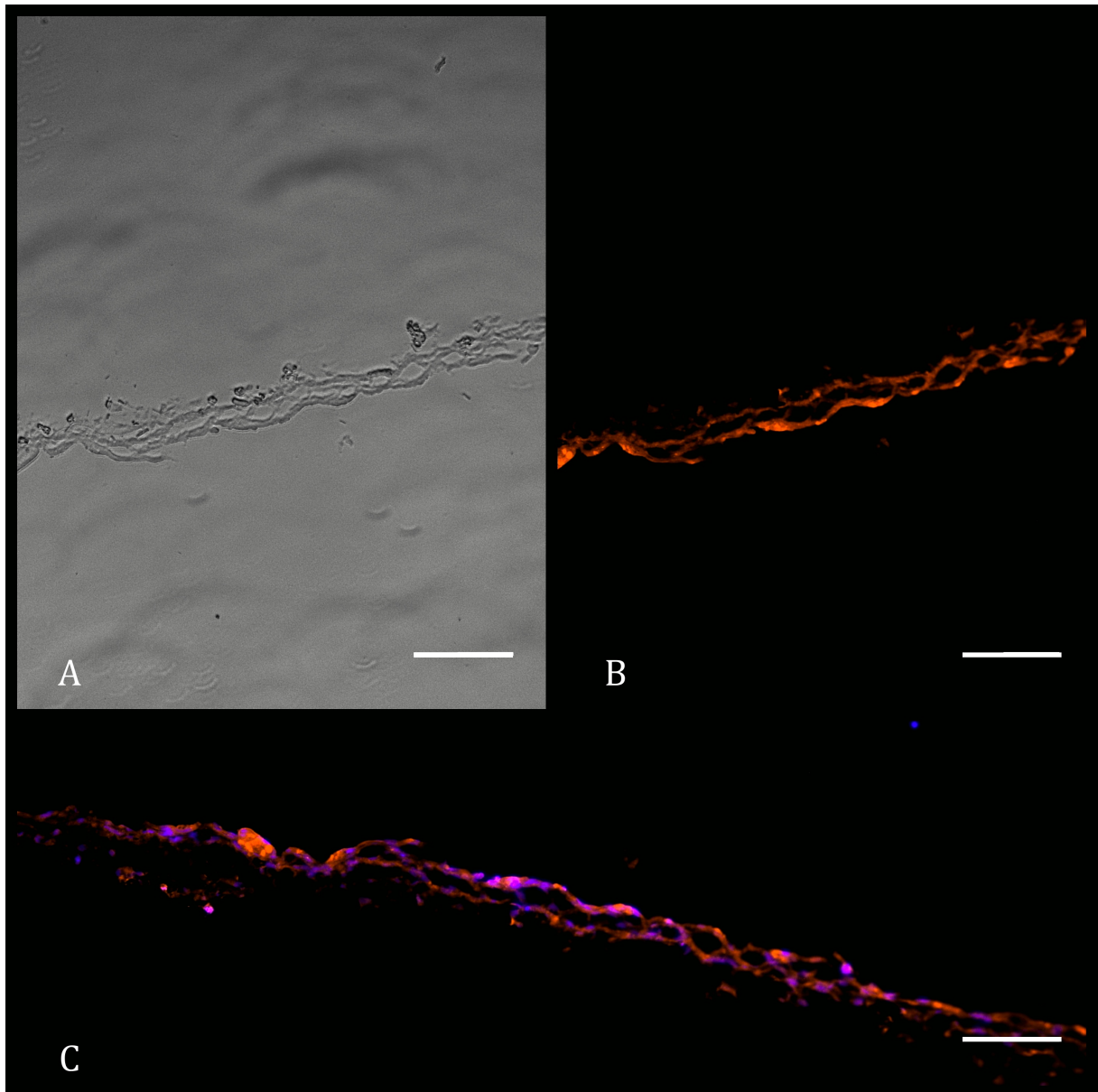
Abbildung 2: Repräsentative Aufnahmen vom Fluoreszenzmikroskop der immunhistochemischen Färbungen gegen Collagen IV: (A) Überlagerung des lichtmikroskopischen Bilds mit dem Fluoreszenzsignal (B) Die Lichtmikroskopische Aufnahme zeigt die Struktur des besiedelten Patches; (C) Die Färbung mit dem Antikörper gegen Collagen IV (gelb) zeigte positive Reaktionen an der Stelle der Zellen auf dem Polyurethanpatch; (D) Die Zellkerne wurden mittels DAPI Färbung repräsentiert; Maßstab A-D : 100µm



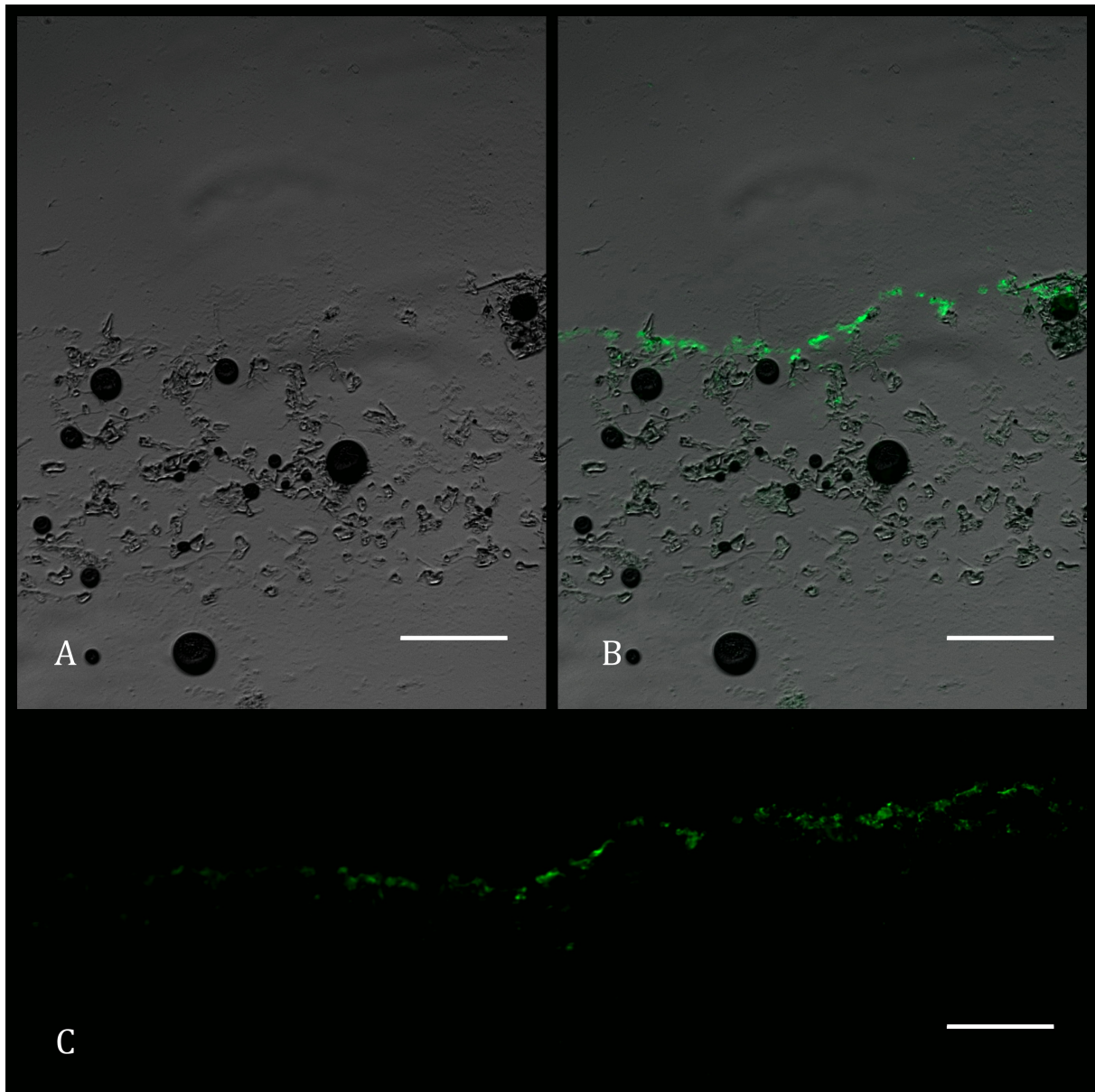


**Abbildung 3:** Repräsentative Aufnahmen vom Fluoreszenzmikroskop der immunhistochemischen Färbungen gegen Elastin (gelb): (A) Die Lichtmikroskopische Aufnahme zeigt die Struktur des besiedelten Patches; (B) Überlagerung der lichtmikroskopischen Aufnahme mit dem kräftigen Fluoreszenzsignal an der Oberfläche des PU Patches; (C) Die Zellkerne wurden mittels DAPI Färbung repräsentiert; Maßstab (A-D) : 100µm





**Abbildung 4: Repräsentative Aufnahmen vom Fluoreszenzmikroskop der immunhistochemischen Färbungen gegen Laminin (Orange): (A) Die Lichtmikroskopische Aufnahme zeigt die Struktur des besiedelten Patches; (B) Eine stark positive Reaktion gegen Laminin imponiert hier und spricht für den Nachweis der EZM Eine mögliche Hintergrundanfärbung kann hierbei nicht sicher ausgeschlossen werden; (C) Die Zellkerne wurden mittels DAPI Färbung repräsentiert; Maßstab (A-C): 100µm**



**Abbildung 5: Repräsentative Aufnahmen vom Fluoreszenzmikroskop der immunhistochemischen Färbungen gegen Fibronectin (Grün). (A) Die Lichtmikroskopische Aufnahme zeigt die Struktur des besiedelten Patches; (B) Eine positive Reaktion gegen Laminin imponiert hier und spricht für den Nachweis der EZM und gegen eine Ablagerung des Antikörpers im PU Material; Maßstab (A-C) 100µm**

## 7.5 Statistische Auswertung

Zeit nach Zellaussaat (h)	FIBROBLASTEN				ENDOTHELZELLEN			
	24	48	72	24-72h	24	48	72	24-72h
Filter/Patient 1	0,128	0,089	0,185	0,445				
Filter/Patient 2	0,45	0,641	0,7	0,556	0,25	0,504	0,49	0,96
Filter/Patient 3	0,564	0,802	1,16	1,057	0,298	0,429	0,608	1,04
Filter/Patient 4	0,277	0,366	0,203	-0,267				
Filter/Patient 5								
Filter/Patient 6					0,198	0,2	0,215	0,086
Filter/Patient 7	0,512	0,756	0,764	0,492				
Filter/Patient 8	0,346	0,316	0,307	-0,113				
Filter/Patient 9								
Filter/Patient 10	0,716	0,577	0,97	0,355	0,267	0,193	0,226	-0,154
Kontrolle 1	0,253	0,169	0,258	0,020	0,271	0,402	0,482	0,779
Kontrolle 2	0,181	0,139	0,218	0,204	0,168	0,248	0,306	0,821
p-Wert (zweiseitig)	0,037	0,012	0,044	0,233	0,653	0,957	0,948	0,373

**Tabelle 1: WST-1 Proliferationsassay mit zweiseitigem T-Test für unverbundene Stichproben; Messzeitpunkt nach Zellaussaat zu t=24h, t=48h und t=72; Das Wachstumsverhalten der FB und EC zwischen 24-72h ist die prozentuale Veränderung der Extinktionswerte zwischen 24h und 72h; grün unterlegt: zweiseitige Signifikanz auf dem 0,05 Niveau.**

	Lebensalter			Bypass-Zeit	EuroSCORE II	FB Aktivität t=24h	FB Aktivität t=48h	FB Aktivität t=72h	Wachstum FB 24-72h	EC Aktivität t=24h	EC Aktivität t=48h	EC Aktivität t=72h	Wachstum EC 24-72h
Lebensalter	r			-0.618	0.765	-0.331	-0.134	-0.281	-0.262	-0.657	-0.092	-0.077	0.08
	p-Wert			0.057	0.009	0.469	0.775	0.542	0.571	0.343	0.908	0.923	0.919
	N			10	10	7	7	7	7	4	4	4	4
Bypass-Zeit	r	-0.618			-0.493	0.793	0.521	0.738	0.519	0.651	0.211	0.152	0.021
	p-Wert	0.057			0.147	0.033	0.231	0.059	0.233	0.349	0.789	0.848	0.979
	N	10			10	7	7	7	7	4	4	4	4
EuroSCORE II	r	0.765		-0.493		-0.161	-0.126	-0.175	-0.295	-0.819	-0.571	-0.545	-0.428
	p-Wert	0.009		0.147		0.73	0.788	0.707	0.52	0.181	0.429	0.454	0.572
	N	10		10		7	7	7	7	4	4	4	4
FB Aktivität t=24h	r	-0.331		0.793	-0.161		0.812	0.897	0.42				
	p-Wert	0.469		0.033	0.73		0.026	0.006	0.349				
	N	7		7	7		7	7	7				
FB Aktivität t=48h	r	-0.134		0.521	-0.126	0.812		0.88	0.594				
	p-Wert	0.775		0.231	0.788	0.026		0.009	0.159				
	N	7		7	7	7		7	7				
FB Aktivität t=72h	r	-0.281		0.738	-0.175	0.897	0.88		0.762				
	p-Wert	0.542		0.059	0.707	0.006	0.009		0.046				
	N	7		7	7	7	7		7				
Wachstum FB 24-72h	r	-0.262		0.519	-0.295	0.42	0.594	0.762					
	p-Wert	0.571		0.233	0.52	0.349	0.159	0.046					
	N	7		7	7	7	7	7					
EC Aktivität t=24h	r	-0.657		0.651	-0.819						0.459	0.685	0.481
	p-Wert	0.343		0.349	0.181						0.541	0.315	0.519
	N	4		4	4						4	4	4
EC Aktivität t=48h	r	-0.092		0.211	-0.571					0.459		0.903	0.959
	p-Wert	0.908		0.789	0.429					0.541		0.097	0.041
	N	4		4	4					4		4	4
EC Aktivität t=72h	r	-0.077		0.152	-0.545					0.685	0.903		0.964
	p-Wert	0.923		0.848	0.454					0.315	0.097		0.035
	N	4		4	4					4	4		4
Wachstum EC 24-72h	r	0.08		0.021	-0.428					0.481	0.959	0.964	
	p-Wert	0.919		0.979	0.572					0.519	0.041	0.035	
	N	4		4	4					4	4	4	

Tabelle 2: Korrelationsanalyse nach Bravais Pearson und einem zweiseitigen Signifikanztest; grün unterlegt: die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

## 8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema,

*Das Kardiotomiereservoir: Eine neuartige Zellquelle für das kardiovaskuläre Tissue Engineering*

eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder anderer Autoren beruhen sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 16.10.2020

Sophie von Nathusius